

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DAS PROPRIEDADES ANTI-INFLAMATÓRIAS, EM  
MODELO DE COLITE, DE UMA LECTINA PURIFICADA DO MEDRONHEIRO  
(*Arbutus unedo*)**

Cátia Vanessa Querido Monteiro

Dissertação orientada pela Professora Doutora Ana Cristina F. da Conceição Ribeiro  
e, coorientada pela Professora Doutora Prof<sup>a</sup> Doutora Maria Eduardo C. Morgado  
Figueira

Mestrado em Controlo de Qualidade e Toxicologia dos Alimentos

2017



Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DAS PROPRIEDADES ANTI-INFLAMATÓRIAS, EM  
MODELO DE COLITE, DE UMA LECTINA PURIFICADA DO MEDRONHEIRO  
(*Arbutus unedo*)**

Cátia Vanessa Querido Monteiro

Dissertação orientada pela Professora Doutora Ana Cristina F. da Conceição Ribeiro  
e, coorientada pela Professora Doutora Prof<sup>a</sup> Doutora Maria Eduardo C. Morgado  
Figueira

Mestrado em Controlo de Qualidade e Toxicologia dos Alimentos

2017



*À minha, para sempre, amada tia Vera Maria*

*Aos meus irmãos Andreia, Afonso e Bernardo*



## Agradecimentos

Em primeiro lugar tenho que agradecer profundamente à pessoa que esteve comigo incondicionalmente durante toda esta aventura, juntas conseguimos contar esta história, muito obrigada Prof<sup>a</sup> Doutora Ana Cristina Ribeiro. Agradeço por tudo, pelo apoio a nível intelectual, mas também por todo o apoio e dedicação a mim enquanto pessoa, agradeço por ter acreditado em mim e nas minhas capacidades e por todo o tempo e paciência dispensados durante todos estes meses. Consigo aprendi o que é ser um profissional a sério, muito obrigada.

Tenho também que agradecer a toda a equipa do laboratório do Instituto Superior de Agronomia e principalmente ao Prof. Doutor Ricardo Ferreira por ter permitido que integrasse o seu grupo de trabalho. Um muito obrigada a todo o grupo, à Doutora Ana Lima, ao João e à Maria João. Um obrigada gigante à Joana e à Patrícia por todos os almoços e por todos os momentos bons, por toda a alegria e gargalhadas que passámos juntas. Não posso também deixar de agradecer à Tina e à Raquel, sem vocês o início deste trabalho não teria sido a mesma coisa, nunca esquecerei as nossas noites no laboratório a “discutir” com lectinas. À Isabel, a minha mentora em todo este processo, obrigada por me teres passado todo o teu conhecimento e todos os teus truques, pois tornaste todo este trabalho mil vezes mais simples.

À minha coorientadora Prof<sup>a</sup> Maria Eduardo Figueira e a toda a equipa do biotério da Faculdade de Farmácia, ao Prof. João e à Rosa, obrigada por toda a ajuda e apoio durante todo o ensaio *in vivo*.

Aos meus pais obrigada por todos os “vais conseguir”, sem vocês não teria conseguido. Obrigada pelo carinho e dedicação, pelo ombro amigo, por serem como são e principalmente por serem dois dos meus grandes exemplos tanto a nível profissional como pessoal. Obrigada mãe pelas inúmeras horas ao telefone, mesmo longe fisicamente, nunca me deixaste sozinha nesta luta. Obrigada pai por estares sempre lá para mim, por seres um dos meus grandes companheiros de vida.

Aos meus avós obrigada por acharem que eu sou sempre a melhor, obrigada pelos abraços, pelas palavras positivas e de carinho, e pelos almoços de quarta-feira. À Maria, a minha segunda mãe, agradeço-te por me teres alimentado durante todo este ano, por teres dito sempre que eu ia conseguir e pelos abraços quando chegava a casa depois das 22 horas e ia fazer noite a seguir no hospital, foste fundamental. À minha tia Fati, obrigada por seres sempre o nosso porto seguro, obrigada por nos teres acolhido em tua casa sem nada em troca e por nos tratares como se fossemos teus filhos, se sou o que sou hoje, muito devo a ti e ao teu amor.

À Leila, à Renata, à Inês, ao João, à Rita, ao André, à Ana, à Olga, à Di, e à Djeniffer obrigada por acreditarem que a vossa amiga era capaz, pelo apoio e por todos os jantares tardios após horas infindáveis de laboratório

À minha amiga, companheira de casa e aventura Leonor, obrigada por estares comigo em Faro, e principalmente por teres aturado todas as minhas dúvidas e questões durante a escrita desta dissertação. Tenho também que agradecer à minha nova amiga e companheira de casa Margarida, por apesar de só me conheceres há um mês, me teres apoiado e animado sempre que achei que isto era impossível de se fazer.

A toda a equipa do Serviço de Sangue do CHO-UTV, sem a vossa ajuda não teria conseguido fazer este mestrado, obrigada pelas trocas e por terem esperado que eu chegasse de Lisboa sempre que não consegui chegar a horas, obrigada pelo apoio e por todo o carinho.

Não posso deixar de agradecer a uma das pessoas que foi e sempre será uma das mais importantes na minha vida, um dos meus grandes exemplos na vida, obrigada tia por tudo, por teres acreditado que eu um dia conseguiria alcançar os meus sonhos, obrigada por todas as palavras de apoio e por teres feito de mim um ser humano muito melhor. Obrigada por teres sido a melhor tia que alguém pode pedir, este trabalho é completamente dedicado a ti, à tua força e à tua coragem, foste a minha fonte de inspiração durante todo este processo.

Por fim agradeço às três pessoas mais importantes da minha vida, os meus três irmãos lindos Andreia, Afonso e Bernardo. Andreia obrigada por seres a minha maior companheira desde há 21 anos, obrigada por teres feito parte deste trabalho, ajudaste-me imenso, sem ti não teria conseguido. Obrigada por todas as folhinhas cortadas, por toda a ajuda nos extratos, pelas boleias e pelo carro emprestado, não imaginas o quanto te sou grata por tudo isso. Afonsinho obrigada pelos beijinhos e pelos abraços, obrigada por seres um menino de 3 anos muito crescido e por achares que eu sou a maior mana do mundo. Ao meu Bernardo, o meu mano de 1 aninho que me enche de alegria quando me abraça e diz o meu nome. Obrigada a vocês os três que me ensinaram o que é amar incondicionalmente alguém e que todos os dias me tornam uma pessoa melhor.

Muito obrigada a todos, que de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.



## Resumo

As lectinas são um vasto grupo de proteínas que conseguem ligar-se especificamente a recetores glicosilados. Estão presentes em todos os seres vivos e possuem características bioquímicas que as tornam únicas no reconhecimento celular. Estas são excelentes diferenciadoras de células com alterações a nível destes recetores glicosilados, ou seja, reconhecem células com aberrações glicómicas, características dos mais variados processos patológicos, especialmente os tumorais. Tendo em conta as suas características bioquímica e as suas capacidades de descodificação de glicocódigos, as lectinas têm sido alvo de intensa investigação biomédica, com grande investimento nas suas capacidades biotecnológicas, com vista à sua aplicação terapêutica.

O carcinoma colorretal é o segundo carcinoma mais prevalente em Portugal, no mundo é o terceiro cancro que mais afeta homens e mulheres. Este é influenciado por fatores não controláveis, como a idade, a genética e o historial de doenças inflamatórias do cólon (como é o caso da colite ulcerosa) e por fatores ambientais, como os hábitos alimentares e de exercício físico. Muitas das vezes o processo de desenvolvimento e progressão deste carcinoma passa por alterações genéticas que afetam os mecanismos de proliferação, sobrevivência, migração e invasão celulares, ou por modificações pós-traducionais, como a modificação da glicosilação proteica.

O estudo em questão teve como objetivo dar continuidade a trabalhos já desenvolvidos, que demonstraram que uma lectina purificada de *Arbutus unedo* evidenciou, *in vitro*, atividade antitumoral. Neste projeto estudou-se a ação anti-inflamatória desta lectina de *A.unedo*, em modelo *in vivo* (modelo de colite em murganhos).

Os resultados dos ensaios *in vivo* demonstraram que a lectina atenua os efeitos da colite, prevendo-se por isso, a sua ligação aos recetores glicosilados das células do cólon alterado, exibindo especificidade para estes recetores anómalos, fazendo regredir a lesão, provavelmente por um mecanismo de morte das células alteradas. Associado ao facto de que os ensaios com a lectina, em murganhos sem colite, não evidenciaram nenhuma alteração do cólon, mostra que a lectina não revelou especificidade para estes recetores, das células do cólon saudável, uma vez que este tecido não evidenciou nenhuma alteração, concluindo-se assim que esta lectina pode ser específica para os recetores do tecido inflamado.

**Palavras chave:** Lectina; carcinoma colorretal; aberração glicómica; colite ulcerosa; inflamação

## Abstract

Lectins are a wide/broad group of proteins which can specifically link themselves to glycosylated receptors. These proteins are present throughout nature and possess biochemical characteristics which make them unique in terms of cellular recognition. They are excellent differentiators of cells in which alterations in terms of these glycosylated receptors can be found. That is to say that these proteins recognise cells with glycomic aberrations which are characteristic of the most varied pathological processes, especially tumoural ones. Their biochemical characteristics and their capacity to decode glycocodes, lectins have been targeted to intense biomedical research, with great investment in their biotechnological capacities, aiming at their therapeutic applications.

Colorectal cancer is the second most prevailing cancer in Portugal, and the third one which most affects men and women throughout the world. It is influenced by non- controllable factors such as age, genetics and inflammatory colon diseases history (as is the case for ulcerative colitis) and by environmental factors such as dietary habits and physical activity. Often, the process of development and progression of this cancer goes through genetic alterations which affect the cellular proliferation, survival, migration and invasion mechanisms or through post- translational modifications such as the modification of the protein glycosylation.

The aim of the study in question was to continue previously developed works, which demonstrated that a purified *Arbutus unedo* lectin demonstrated, *in vitro*, antitumoural activity. In this project, the anti- inflammatory action of this *A.unedo* lectin was studied in a *in vivo* model (model of colitis in mice).

The results of the *in vivo* trials demonstrated that the lectin mitigates the effects of colitis predicting, for that reason, its link to the glycosylated receptors of the altered colon's cells. The lectins display specificity for these anomalous receptors and revert the injury, probably through a mechanism of altered cell death mechanisms. Associated to the fact that the trials with lectin in mice without colitis did not reveal any alterations to the colon shows that the lectin did not reveal specificities to these receptors in cells of healthy colons, seen as this tissue did not reveal any injury. Thus, we conclude that this lectin is probably specific to receptors of inflamed tissue.

**Keywords:** Lectin, colorectal cancer, glycomic aberration, ulcerative colitis, inflammation.

## Abreviaturas

Abs	Absorvância
Ag	Antígeno
Aun	<i>Arbutus unedo</i>
BAX	Gene que codifica para a proteína pro-apoptótica Bax, da família Bcl-2
Bax	Bcl-2-associated X protein
BCL-2	Gene que codifica para a proteína anti-apoptótica Bcl-2, da família Bcl-2
Bcl-2	B-cell lymphoma protein 2
bisacrilamida	N',N' – metilenobisacrilamida
BSA	Albumina do Soro Bovino
Caspase	Protease de cisteína
CBB G250	Coomassie Brilliant Bleu G250
Con A	Concanavalina A
CRD	Domínio de Reconhecimento
Da; kDa	Dalton; QuiloDalton
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
HT29	Linha celular humana do adenocarcinoma do cólon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LDH	Desidrogenase Lactea
MMP	Metaloproteinase de Matriz
MLs	Mistletoe Lectins
NaCl	Cloreto de sódio
p53	Proteína supressora tumoral p53
PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Tampão de Fosfato Salino
pH	Potencial de Hidrogénio Iónico (Escala Sorensen)
RCA	<i>Ricinus communis</i> agglutinin
Rh	Rhesus
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida – Dodecil sulfato de sódio
TBST	TBST
TEMED	N,N,N',N' - tetrametiletlenodiamina
TNBS	Ácido Trinitrobenzeno sulfónico

TNF	Factor de necrose tumoral
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano (2-Amino-2-hidroxymethyl-propane-1,3-diol)
TRIS-HCl	Tris (hydroxymethyl) aminomethane Hydrochloride
Tween	Monolaurato de polioxilenossorbitano
U.H.	Unidade Hemaglutinante

## Lista de Símbolos

A	Ampere
mA	Miliampere ( $10^{-3}A$ )
G	Grama
M	Massa
V	Volume
M	Molar (mol/L)
mM	Milimolar ( $10^{-3}M$ )
$\mu M$	Micromolar ( $10^{-6}M$ )
v/v	Volume/Volume
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem

# Índice Geral

Agradecimentos .....	I
Resumo.....	III
Abstract.....	IV
Abreviaturas .....	V
Lista de Símbolos.....	VI
Índice de Figuras.....	X
Índice de Tabelas .....	XI
<b>Capítulo I – Introdução Teórica .....</b>	<b>- 1 -</b>
1. Lectinas .....	- 2 -
1.1 Definição .....	- 2 -
1.2 Estrutura molecular das lectinas .....	- 3 -
1.3 Classificação .....	- 4 -
a) Classificação de acordo com a especificidade aos hidratos de carbono .....	- 4 -
b) Classificação de acordo com a estrutura .....	- 5 -
c) Classificação de acordo com as famílias evolutivas relacionadas.....	- 5 -
1.4 Mecanismo molecular de ligação ao hidrato de carbono.....	- 6 -
1.5 Papel e funções biológicas das lectinas.....	- 8 -
1.5.1 Lectinas de plantas com ação antitumoral .....	- 9 -
1.6 Bioaplicações das lectinas .....	- 12 -
2. Glicosilação celular .....	- 15 -
2.1 Glicoma celular e glicosilação .....	- 15 -
2.2 Alterações anormais da glicosilação .....	- 16 -
2.2.1 Alterações das ramificações N- e O- glicanas.....	- 17 -
3. Cancro colorretal .....	- 19 -
3.1 Carcinoma colorretal.....	- 19 -
3.1.1 Epidemiologia .....	- 19 -
3.1.2 Inflamação.....	- 20 -
3.1.3 Diagnóstico.....	- 22 -

3.1.4	Tratamento .....	- 23 -
3.1.5	Caraterísticas da aberração glicômica nas células do carcinoma colorretal .....	- 23 -
3.1.6	Progressão e alterações moleculares no carcinoma colorretal .....	- 24 -
4.	Flora Mediterrânica: <i>Arbutus unedo</i> , à descoberta de novas lectinas .....	- 25 -
5.	Objetivos.....	- 26 -
<b>Capítulo II - Material e Métodos .....</b>		<b>- 28 -</b>
1.	Caraterização polipeptídica de extratos de <i>Arbutus unedo</i> .....	- 29 -
1.1	Material.....	- 29 -
1.1.1	Material biológico.....	- 29 -
1.2	Métodos.....	- 29 -
1.2.1	Extração total de proteína de folhas de <i>Arbutus unedo</i> .....	- 29 -
1.2.2	Determinação da concentração proteica pelo Método de Bradford.....	- 30 -
1.2.3	Avaliação do perfil eletroforético de <i>Arbutus unedo</i> .....	- 30 -
1.2.4	Coloração do gel pelo nitrato de prata .....	- 32 -
1.2.5	Determinação do perfil glicosídico do extrato total .....	- 33 -
1.2.6	Determinação da atividade hemaglutinante .....	- 34 -
2.	Purificação das lectinas de <i>Arbutus unedo</i> por cromatografia troca-iónica.....	- 37 -
2.1	Purificação de lectinas através da coluna Q-sepharose.....	- 37 -
2.2	Purificação da fração não adsorvida da coluna Q-sepharose pela coluna Mono-S-37 -	
3.	Ensaio in vivo - modelo de colite .....	- 38 -
3.1	Material.....	- 38 -
3.1.1	Material Biológico animal.....	- 38 -
3.2	Métodos.....	- 38 -
3.2.1	Indução da colite .....	- 38 -
3.2.2	Grupos em estudo .....	- 39 -
3.2.3	Avaliação macroscópica da severidade da colite.....	- 39 -
3.2.4	Ensaio histológico e de imunohistoquímica (em avaliação) .....	- 40 -
<b>Capítulo III – Resultados e Discussão .....</b>		<b>- 41 -</b>

1. Caraterização polipeptídica de extrato de <i>Arbutus unedo</i> .....	- 42 -
1.1 Determinação da concentração proteica pelo Método de Bradford .....	- 42 -
1.2 Avaliação do perfil eletroforético de <i>Arbutus unedo</i> .....	- 43 -
1.3 Determinação do perfil glicosídico do extrato total .....	- 44 -
1.4 Determinação da atividade hemaglutinante de extrato proteico de <i>A.unedo</i> ..	- 45 -
2. Purificação das lectinas de <i>Arbutus unedo</i> .....	- 47 -
2.1 Avaliação da atividade hemaglutinante ao longo da purificação .....	- 48 -
2.2 Caracterização polipeptídica das frações proteicas obtidas por cromatografia troca-iônica.....	- 49 -
3. Avaliação in vivo (modelo de colite), da atividade da fração purificada de lectinas do <i>A. unedo</i> .....	- 50 -
<b>Capítulo IV – Conclusões Finais</b> .....	- 55 -
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	- 58 -

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> – Estrutura representativa da Concanavalina A – estrutura terciária de um monómero.....	- 3 -
<b>Figura 2</b> - Interação lectina-glicoconjugado presente na membrana celular.....	- 8 -
<b>Figura 3</b> - Mediação por lectinas (atuam como meio de adesão) de interação célula-célula -	9
<b>Figura 4</b> – Mecanismo de ação antitumoral de lectinas de plantas. ....	- 10 -
<b>Figura 5</b> – Representação das várias classes de glicoconjugados expressos em células humanas. ....	- 16 -
<b>Figura 6</b> - Biossíntese de O-glicanos .....	- 18 -
<b>Figura 7</b> - Incidência geográfica, em 2012, do carcinoma colorretal a nível mundial. ....	- 19 -
<b>Figura 8</b> - Resultados da inflamação aguda ou crónica: cicatrização por fibrose. ....	- 21 -
<b>Figura 9</b> - Alterações da mucosa intestinal características da colite ulcerosa .....	- 22 -
<b>Figura 10</b> - Esquema da síntese do antígeno SLea.....	- 24 -
<b>Figura 11</b> - <i>Arbutus unedo</i> : folha, flor e fruto.....	- 26 -
<b>Figura 12</b> - Padrões de aglutinação eritrocitária.....	- 36 -
<b>Figura 13</b> - Curva de calibração de BSA.....	- 42 -
<b>Figura 14</b> - SDS-PAGE R a 17,5% (m/v) em acrilamida, do extrato total de <i>A.unedo</i> , com revelação pela $\text{AgNO}_3$ . ....	- 43 -
<b>Figura 15</b> - Perfil eletroforético, transferência e glicodeteção do extrato total de <i>A.unedo</i> ..	-44
<b>Figura 16</b> - Atividade hemaglutinante de extrato total de <i>A.unedo</i> .....	- 45 -
<b>Figura 17</b> - Representação gráfica final (cromatograma) da purificação proteica pela coluna Mono-S. ....	- 47 -
<b>Figura 18</b> - Atividade hemaglutinante das diferentes frações purificadas do extrato de <i>A.unedo</i> .....	- 49 -
<b>Figura 19</b> - SDS-PAGE R a 17,5% (m/v) de acrilamida do extrato total de <i>A.unedo</i> e, respectivas frações ao longo da purificação .....	- 50 -
<b>Figura 20</b> - Observações a microscópio cirúrgico do cólon aberto transversalmente.....	- 52 -
<b>Figura 21</b> - Efeito do extrato purificado de <i>A.unedo</i> no comprimento do cólon (cm) .....	- 52 -
<b>Figura 22</b> - Efeito do extrato purificado de <i>A.unedo</i> no comprimento da lesão (cm).....	- 53 -
<b>Figura 23</b> - Efeito do extrato purificado de <i>A.unedo</i> na avaliação da severidade da diarreia.-	53 -



## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Classificação de lectinas de plantas com base na filogenia. ....	- 6 -
<b>Tabela 2</b> - Efeitos inibitórios de lectinas em diversas celulas malignas in vitro.....	- 11 -
<b>Tabela 3</b> - Efeitos inibitórios de lectinas em diversas células malignas in vitro.....	- 13 -
<b>Tabela 4</b> - Efeitos inibitórios de lectinas em diversas celulas malignas in vitro.....	- 14 -
<b>Tabela 5</b> - Efeitos inibitórios de lectinas em diversas celulas malignas in vivo. ....	- 14 -
<b>Tabela 6</b> - Avaliação da severidade da colite. ....	- 40 -
<b>Tabela 7</b> - Teor proteico do extrato total de <i>Arbutus unedo</i> .....	- 43 -



## **Capítulo I – Introdução Teórica**

## 1. Lectinas

As proteínas são a peça fundamental na transmissão de mensagens aos tecidos, são essenciais na reparação de danos, e desencadeiam reações fundamentais à vida humana. São responsáveis por inúmeras funções fisiológicas no humano tais como, a catálise de transformações de químicas, o controlo metabólico, o transporte de oxigénio e nutrientes, bem como pela contração muscular (Jones & Thornton, 1996).

As lectinas, são proteínas, tendo sido inicialmente, denominadas por “hemaglutininas”, sendo as primeiras lectinas descritas por Hermann Stillmark, em 1888, quando observou reações de hemaglutinação de eritrócitos por extratos de plantas, mais concretamente por uma fração proteica de *Ricinus communis* (Stillmark, 1888). Desde então, o termo aglutinina tem sido utilizado para descrever moléculas com a capacidade de aglutinar eritrócitos (Hartley & Lord, 2004). O termo lectina (do latim *legere*, selecionar), surgiu apenas em 1954, (Boyd & Shapleigh, 1954), referindo-se à capacidade de algumas glicoproteínas aglutinarem grupos sanguíneos específicos (Peumans and Damme, 1995).

As lectinas têm sido alvo de enorme investigação, uma vez que interagem especificamente com glicanos, exercendo variados efeitos biológicos, levando à introdução de novas tecnologias de aplicação. Os glicanos, por sua vez, são um grupo molecular muito mais variado do que as lectinas, devido ao monómeros que os constituem. Os glicanos, estão presentes na membrana celular, sendo que estes têm uma enorme capacidade de codificação, estando envolvidos em processos de reconhecimento celular, adesão celular, migração e invasão celular.

Podemos encontrar lectinas na grande maioria das células, membranas, e secretomas de todos os seres vivos, nomeadamente, plantas, algas, animais, microrganismo, fungos e até mesmo em vírus (Faheina-Martins *et al.*, 2012). Ou seja, quanto à sua ocorrência as lectinas estão largamente distribuídas pela natureza. Nas plantas, o maior reservatório de lectinas, estão presentes em todos os tecidos (raiz, semente, folha e fruto) (De Mejia & Prisecaru, 2005).

### 1.1 Definição

As lectinas são um grupo de proteínas muito diversificado (Silva *et al.*, 2014), são proteínas ubiquitárias da natureza, presentes na grande maioria das classes dos seres vivos, de origem não imunológica, que exibem capacidade de descodificar mensagens biológicas, e têm grande afinidade para os hidratos de carbono, ligando-se a estes de forma reversível através de ligações Van der Waals e ligações por pontes de hidrogénio (Goldstein *et al.*, 1980; Lis & Sharon, 1998). A ligação específica ao hidrato de carbono, é a característica que diferencia as lectinas, e torna o seu estudo fundamental, uma vez que os hidratos de carbono são fundamentais em diversos processos químicos e biológicos. As lectinas podem também

precipitar glicoconjugados, sendo necessário salientar, que estas proteínas têm, pelo menos, um domínio não catalítico que lhes permite reconhecer e ligarem-se a mono-, poli- e oligossacáridos sem alterar a sua estrutura inicial (Silva *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014).

## 1.2 Estrutura molecular das lectinas

A cristalografia tem sido fundamental para o estudo da estrutura molecular das lectinas, sendo que tem demonstrado que lectinas de diferentes famílias, tendencialmente, têm estruturas moleculares distintas. Tendo em conta a diversidade encontrada, diferentes famílias vão ser específicas para diferentes hidratos de carbono, ou seja, os locais de reconhecimento variam entre as diversas famílias (Loris, 2002).

A concanavalina A (ConA), foi a primeira lectina cuja estrutura tridimensional foi estudada, sendo até hoje a lectina mais caracterizada. Pertence à família das leguminosas, sendo esta família, a mais estudada e caracterizada, entre as várias famílias de lectinas. Na figura 1 está representada a estrutura representativa (estrutura terciária) da ConA.



**Figura 1** – Estrutura representativa da Concanavalina A – estrutura terciária de um monómero.  
Adaptado de Srinivas *et al.*, 2001.

Na família das **lectinas de leguminosas**, as lectinas são constituídas por 2 ou 4 subunidades de pesos moleculares entre os 25-30 kDa muito semelhantes entre si, estas subunidades são constituídas por cerca de 250 aminoácidos, e normalmente com uma ligação forte a  $\text{Ca}^{2+}$  e um ião metálico de transição ( $\text{Mg}^{2+}$ ) (De Hoff *et al.*, 2009).

As lectinas de leguminosas, apresentam homologia e conservadorismo aminoacídico, sendo que cerca de 20% dos resíduos de aminoácidos não variam e, muitos destes resíduos estão envolvidos na interação com os hidratos de carbono, relacionados com os metais de coordenação e envolvidos na formação do *pockets* hidrofóbicos (Ambrosi *et al.*, 2005; De Hoff *et al.*, 2009). Apesar da conservação acima descrita, podem surgir algumas alterações nas sequências de aminoácidos responsáveis pela interface dos monómeros. Estas alterações, quando conjugadas com a presença/ausência de glicosilação, parecem interferir com a

organização dos monómeros, logo com a estrutura dimérica e tetramérica, resultando em pequenas diferenças na estrutura quaternária (Srinivas *et al.*, 2001).

Quanto às estruturas primária, secundária e terciária sabe-se que as lectinas, da família de leguminosas, têm muitas semelhanças estruturais.

No oposto, a família das lectinas de cereais (trigo, cevada, arroz e centeio), é notoriamente diferente da família das leguminosa, sendo constituída por proteínas de menor peso molecular, normalmente homodímeros de 2 subunidades ( $\pm 18$  kDa). As lectinas desta família são muito homólogas entre si (De Hoff *et al.* 2009).

### **1.3 Classificação**

As lectinas são um vasto grupo de proteínas, compostas normalmente entre 2 a 4 subunidades, muitas são metaloproteínas e normalmente são glicosiladas (Sharon & Lis, 1990), este grupo inclui diversas famílias proteicas que diferem entre si bioquímica e físico-quimicamente, quanto à sua estrutura molecular, à sua atividade biológica e à sua afinidade para os diferentes hidratos de carbono (Galegos *et al.*, 2014). A classificação das lectinas em famílias é fundamental para que se possa compreender melhor as suas funções. Esta classificação pode ser feita, normalmente, quanto à sua especificidade aos hidratos de carbono, à sua estrutura, e com base nas famílias evolutivas relacionadas.

#### **a) Classificação de acordo com a especificidade aos hidratos de carbono**

Inicialmente as lectinas foram classificadas, de forma muito simples, de acordo com a sua afinidade para diferentes grupos sanguíneos, tendo em conta o fenómeno de hemaglutinação, pondo em evidência o poder necessário para que um monossacárido inibisse a sua atividade hemaglutinante (Rego *et al.*, 2002). Na rotina laboratorial, esta é a classificação usada.

As lectinas são classificadas de acordo com a sua estrutura e especificidade ao hidrato de carbono. A especificidade é uma característica utilizada na classificação desde 1957 por Makela, que apresentou um modelo de classificação segundo a afinidade por oses. Esta classificação tem sido vastamente alargada por diferentes investigadores, sendo esta, atualmente constituída por 6 grupos distintos:

**Grupo I – Lectinas glucose/manose** – as interações com os monossacáridos envolvem ligações hidrogénio com resíduos conservados. Também são fundamentais as interações Van der Waals com os resíduos aromáticos e o anel dos glícidos. Um dos exemplos deste grupo é a Con A;

**Grupo II – lectinas galactose/N-acetil-galactosamina** – grupo a que pertence a maioria das lectinas. Este grupo tem um “loop” D com um comprimento superior ao da manose, glucose, ou L-fucose no centro de ligação primário;

**Grupo III – Lectinas N-acetil-glucosamina** – este grupo é constituído por um menor número de lectinas lectinas. A BPA (*Bauhinia purpurea* aglutinina), é exemplo deste grupo;

**Grupo IV – Lectinas L-fucose** – neste grupo existem diferenças no loop D, no entanto há manutenção da sua dimensão;

**Grupo V – Lectinas ácido siálico (Ácido N-acetilneuraminico)** – são em número muito reduzido, as lectinas que são específicas para este hidrato de carbono;

**Grupo VI – Lectinas específicas de oligossacáridos e polissacáridos complexos** – existem muito poucas lectinas descritas que reagem apenas com oligossacáridos.

#### **b) Classificação de acordo com a estrutura**

Com base na estrutura de uma lectina, Van Damme e colaboradores (1998) propuseram outro sistema de classificação de lectinas, que as divide em 4 classes:

**Merolectinas** – têm apenas um centro de ligação (Vasconcelos & Oliveira, 2004), são pequenos polipéptidos individuais, que uma vez que são monovalentes não conseguem precipitar glicoconjugados, nem aglutinar células;

**Hololectinas** – contêm no mínimo 2 centros de ligação idênticos ou muito parecidos. São bi ou multivalentes, logo conseguem aglutinar e/ou precipitar glicoconjugados. A maioria das lectinas de plantas faz parte deste grupo;

**Quimerolectinas** – contêm um ou mais centros de ligação a hidratos de carbono, e um centro com atividade biológica (normalmente, atividade catalítica) (Vasconcelos & Oliveira, 2004);

**Superlectinas** – contêm pelo menos 2 centros de ligação a hidratos de carbono, diferentes.

#### **c) Classificação de acordo com as famílias evolutivas relacionadas**

Recentemente, Van Damme e colaboradores (2008), desenvolveram outra classificação de lectinas, com base em toda a informação existente sobre mesmas. Com recurso a análises proteómicas e de clonagem molecular foi possível compreender a sequência detalhada das lectinas. Esta análise permitiu distinguir as lectinas em 12 famílias tendo em conta as suas proximidades evolucionárias e as suas estruturas. As 12 famílias estão apresentadas na tabela 1.

**Tabela 1** - Classificação de lectinas de plantas com base na filogenia.

Abreviatura	Lectina representativa	Família	Especificidade
ABA	<i>Agaricus bisporus</i> aglutinina	Domínio aglutinina <i>Agaricus bisporus</i>	Galactose
ACA	<i>Amaranthus caudatus</i> aglutinina	Amarantinas	N-acetyl-D-glucosamina
CRA	Aglutininas relacionadas com quitina	Classe V ligantes de quitina	N-glicanos do tipo elevada-manose
CV-N	Cianovirina-N	Domínio Cianovirina	Manose
EEA	Aglutinina <i>Euonymus europaeus</i>	Domínio Aglutinina <i>Euonymus europaeus</i> (EEA)	Manose/Galactose
PCL	Lectina <i>Polygonatum cyrtonema</i>	Domínio Aglutinina <i>Galanthus nivalis</i> (GNA)	Manose/Acido siálico
WGA	Wheat germ aglutinina	Domínio de heveina	N-acetyl-D-glucosamina
JAC	Jacalina	Domínio Jacalina	Manose
Con A	Concanavalina A	Lectinas Leguminosas	Manose
		Domínio Lisina	
CPL	<i>Cucurbitaceae phloem</i>	Dominio Aglutinina <i>Nicotiana Tabacum</i>	
ML-1	<i>European mistletoe</i>	Domínio Ricina-B	β-galactose

Adaptado de Fu *et al.*, 2011

#### 1.4 Mecanismo molecular de ligação ao hidrato de carbono

Apesar do processo de reconhecimento de hidratos de carbono por proteínas ser muito complexo, as lectinas têm capacidade de reconhecer especificamente alguns hidratos de carbono. Como tal, muitas vezes são utilizadas como modelos para o estudo deste tipo de interação (Lorist *et al.*, 1998), sendo fundamental para a compreensão do mecanismo de ligação entre proteínas e ligandos naturais (Ambrosi *et al.*, 2005).

Tendo em conta que se sabe que o reconhecimento de hidratos de carbono por lectinas está muito estudado por técnicas distintas, facilmente se conclui que apesar das diferenças entre lectinas, em cada classe de proteínas existem características chave (Weis & Drickamer, 1996). No que toca aos locais de ligação dos glicanos, estes são, normalmente, depressões superficiais na superfície das proteínas, em todo o caso, acredita-se que este local é “pré-fabricado”, tendo em conta que algumas das alterações conformacionais ocorrem após ligação (Ambrosi *et al.*, 2005) (figura 2).

Apesar da especificidade de cada lectina, existe um denominador comum nas lectinas de leguminosas, possuindo todas, um conjunto de 4 resíduos de aminoácidos iguais: ácido

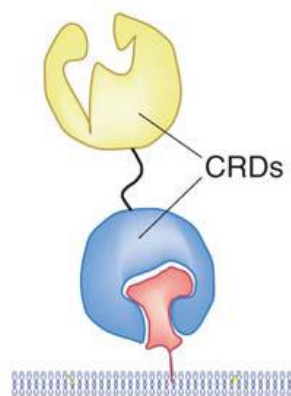


aspártico, asparagina, glicina, e um ácido aromático ou leucina (Asp83, Gly104, Asn127, Tyr125), que estão envolvidos na ligação do ligando (Imberty *et al.*, 1994). Quando há substituição do ácido aspártico ou da asparagina, normalmente ocorre mutagénese, logo vai haver perda de capacidade de ligação aos hidratos de carbono.

O local de combinação para ligação ao hidrato de carbono é formado por resíduos de aminoácidos que estão em 4 *loops*, A, B, C e D, sendo que o ácido aspártico pertence a A, a asparagina pertence C, bem como o resíduo hidrofóbico, e a glicina pertence a B. Já o *loop* D é muito variável no que toca à conformação, duração e sequência, sendo que neste estão as interações adicionais fornecidas por aminoácidos, mostrando que talvez haja algum tipo de relação entre a especificidade da lectina e este circuito (Lis e Sharon 1998).

É também importante salientar o papel dos catiões  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  (ou outro metal de transição), que podem ou não estar relacionados como processo de ligação dos ligandos, mas que auxiliam no posicionamento dos resíduos de aminoácidos que interagem como o glicano. Estes estão normalmente localizados a uma distância, de cerca de 4 Å, sendo que são muito próximos do *pocket* de ligação ao glicano. Quanto à coordenação do  $\text{Ca}^{2+}$  é de salientar que o ácido aspártico e a asparagina (resíduos invariáveis) estão presentes neste processo, sendo que é uma ligação *cis* rara entre a asparagina e o aminoácido que lhe confere a orientação correta (Ambrosi *et al.*, 2005).

As forças que estão normalmente associadas à ligação entre hidratos de carbono e lectinas são as pontes de hidrogénio e as interações hidrofóbicas. Quanto às forças de Van der Waals, estas contribuem também para esta conexão, pois apesar de fracas são fundamentais uma vez que acabam por contribuir significativamente para a ligação total (Lis & Sharon 1998). Já o contato entre as lectinas e os hidratos de carbono é normalmente mediado por moléculas de água, que atuam como elo molecular pois consegue comportar-se tanto como um dador e recetor de hidrogénio, a água acaba por ser essencial no reconhecimento de glicanos, conferindo até mesmo uma excelente especificidade (Ambrosi *et al.*, 2005).

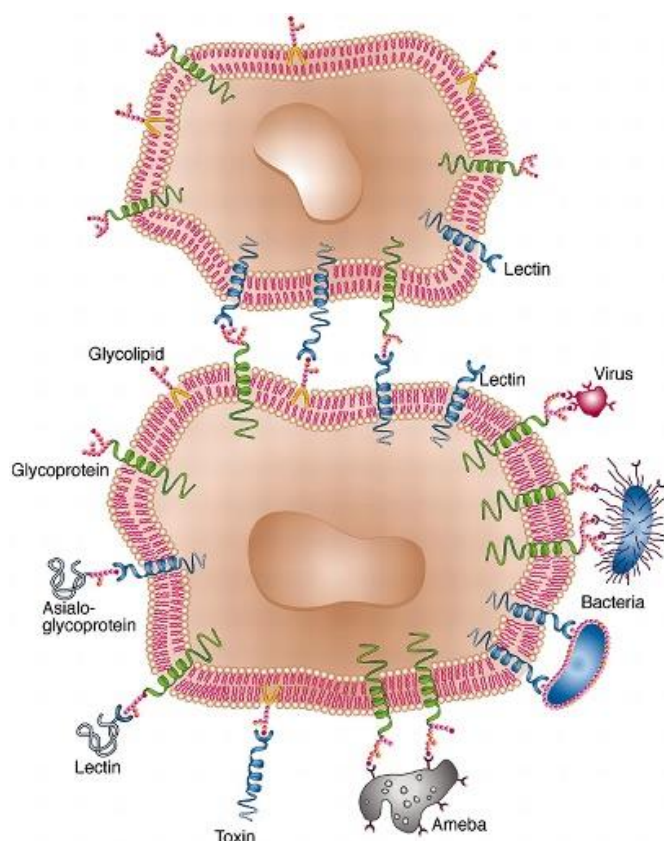


**Figura 2** - Interação lectina-glicoconjugado presente na membrana celular.  
(Adaptado de Liu e Bevins, 2010)

### 1.5 Papel e funções biológicas das lectinas

Como referido anteriormente, as lectinas estão presentes em plantas, microrganismos e animais, sempre envolvidas em inúmeros processos essenciais ao normal funcionamento celular como a mediação da adesão célula-célula ou célula-matriz (como a apoptose por ligação glicano-integrinas e a proliferação celular), como mediadores no reconhecimento celular em diversos sistemas biológicos, sendo ainda mediadores de inflamação e também estando envolvidos em mecanismos de quimioatração.

Devido à sua diversidade funcional, as lectinas têm sido utilizadas com variados objetivos tais como: a ativação de respostas celulares específica, como agentes indutores mitogénicos e aglutinantes celulares (Kabir, 1998). São também importantes na resposta imunitária, estando relacionadas com fenómenos próprios de interação entre o agente patogénico e o hospedeiro (Eichinger, 2001), como citotoxinas na terapia do cancro (Wang *et al.*, 2000), como na inibição do crescimento tumoral (Rolim *et al.*, 2001) e na indução da apoptose e autofagia (Fu *et al.*, 2011), as lectinas estão ainda implicadas nas vias de ativação do complemento através da via das lectinas. As lectinas são também essenciais na resposta imunológica, atuando no início desta resposta contra agentes infecciosos. Neste caso as lectinas, mais concretamente, as lectinas tipo C (CLR), lectinas endógenas do Homem, têm como função o reconhecimento e interação com zonas de glicanos de diversos patógenos, estando envolvidas em diversos processos, nomeadamente na adesão celular (figura.3), ativação plaquetária e do complemento, reconhecimento de agentes patogénicos, integração e remodelação de tecidos, endocitose e fagocitose (Islam & Khan, 2012). Quanto às plantas, é de salientar que estas podem atuar tanto a nível interno como a nível externo. Quanto à sua atuação externa, as lectinas são fundamentais na proteção contra insetos, fungos, bactérias e predadores, podendo ainda, provocar toxicidade no homem, após a sua ingestão (toxicidade aguda e crónica). Sendo assim, facilmente se compreende que não existe um conjunto de funções tipo das lectinas de plantas.



**Figura 3** - Mediação por lectinas (atuam como meio de adesão) de interação célula-célula.  
Adaptado de Sharon e Lis, 2004.

A nível interno, as suas funções principais são normalmente a mobilização de proteínas armazenadas, o transporte de hidratos de carbono, (Ratanapo *et al.*, 2001), sendo que nas plantas poderão ainda estabelecer relações de simbiose, produzindo nódulos capazes de promover a fixação de azoto atmosférico.

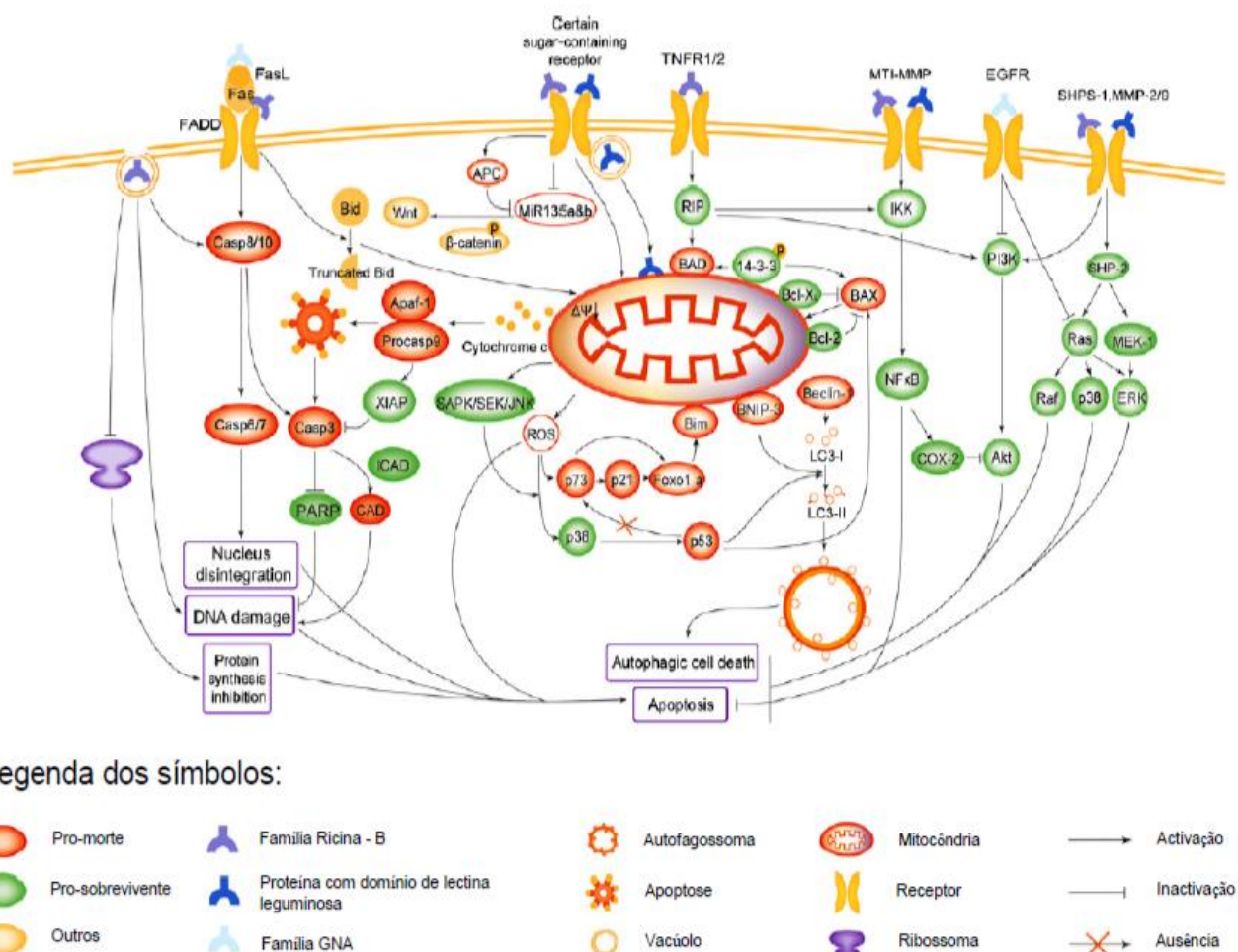
### 1.5.1 Lectinas de plantas com ação antitumoral

No homem as lectinas de plantas, têm um papel antitumoral por morte celular programada (MCP) e necrose, em menor escala.

Os processos de morte celular podem ser divididos em 2 grandes grupos: a morte celular accidental (MCA) e a morte celular regulada (MCR). A morte celular accidental é causada por agressões físicas, químicas e mecânicas, sendo que este tipo de agressão não pode ser corrigida farmacológica nem geneticamente, um exemplo deste tipo de morte é a necrose. Já a morte celular regulada, na qual inclui-se a morte celular programada (MCP), são processos que, ao contrário da anterior, podem ser alterados farmacológica e geneticamente, são exemplos desta a apoptose, a autofagia, a necroptose e morte celular mediada por lisossomas (Kreuzaler & Watson, 2012; Galluzzi *et al.*, 2015)

É de ressaltar a importância da ação antitumoral (Tabela 2), sendo as lectinas, normalmente utilizadas como agentes de reconhecimento tumoral, mais concretamente, devido à descodificação do glicoma celular da célula tumoral, fazendo até mesmo diferenciação entre tumores benignos e malignos. Tal como referido anteriormente estas estão envolvidas nos mecanismos de apoptose celular e autofagia (MCP – mecanismos de eliminação de células danificadas, mantendo a homeostase). Algumas lectinas como a ricina (RCA) e a mistletoe lectin (MLs), têm também uma ação anti-proliferativa e são indutoras de apoptose de células tumorais. Já na Concanavalina A (ConA) a morte celular, pode ser feita por apoptose, autofagia e necrose (Fu *et al.*, 2011) (figura 4).

A figura 4 ilustra, para diferentes famílias de plantas: família ricina, família GNA e família das leguminosas, os diferentes mecanismos desencadeados de morte celular.



**Figura 4** – Mecanismo de ação antitumoral de lectinas de plantas.

Adaptado de Fu *et al.*, 2011



**Tabela 2** - Efeitos inibitórios de lectinas em diversas células malignas *in vitro*.

Lectins	Tumor cells	Type of effect
AAL	H3B human hepatoma, Jar human choriocarcinoma, and ROS rat osteosarcoma	Cytotoxicity/tumor inhibition
ABA	LS174T, SW1222, and HT29 human colon cancer	Cytotoxicity/tumor inhibition, cell agglutination/aggregation
Abrin A	Jurkat and CCRF-HSB-2 adult T-cell lymphoblastic leukemia cells	Cytotoxicity/tumor inhibition, cell agglutination/aggregation
	Molt-4 and HPB-ALL adult T-cell lymphoblastic leukemia cells	Cytotoxicity/tumor inhibition, (cell agglutination/aggregation)
	RPMI 8402 and BALL-1 adult T-cell lymphoblastic leukemia cells	Cytotoxicity/tumor inhibition
	CCRF-CEM adult T-cell lymphoblastic leukemia	Cytotoxicity/tumor inhibition, (cell agglutination/aggregation)
	BALM-1 Acute B-cell lymphoblastic leukemia	Cytotoxicity/tumor inhibition, (cell agglutination/aggregation)
	NALM6 Acute B-cell lymphoblastic leukemia	(Cytotoxicity/tumor inhibition), cell agglutination/aggregation
ACA	HT29 human colon cancer	Cytotoxicity/tumor inhibition
Anti-CD64 Ricin A	Acute human myeloid leukemia	Cytotoxicity/tumor inhibition, apoptosis
CD22-rec Ricin-a	Daudi and Ramos B-cell lines (Burkitt lymphomas)	Cytotoxicity/tumor inhibition
CD22-rec Ricin-a	Acute B-cell lymphoblastic leukemia (B-ALL)	(Cytotoxicity/tumor inhibition)
CD22-rec Ricin-a	Chronic B-cell lymphocytic leukemia (B-CLL)	Cytotoxicity/tumor inhibition
CMA	Merkel cell skin carcinomas	Direct contact/adhesion/binding to cell membrane or receptors
Con A	Merkel cell skin carcinomas	Direct contact/adhesion/binding to cell membrane or receptors
	SK-MEL-28, HT-144, and C32 human melanoma	Cytotoxicity/tumor inhibition
	Hs729 (HTB-153) human rhabdomyosarcoma	Cytotoxicity/tumor inhibition, (direct contact/adhesion/binding to cell membrane or receptors)
	SK-UT-1 and SK-LMS-1 human leiomyosarcoma	Cytotoxicity/tumor inhibition, direct contact/adhesion/binding to cell membrane or receptors
GSA-IA4	SK-MEL-28, HT-144, and C32 human melanoma	Cytotoxicity/tumor inhibition
	Hs729 (HTB-153) human rhabdomyosarcoma	Cytotoxicity/tumor inhibition, (direct contact/adhesion/binding to cell membrane or receptors)
	SK-UT-1 and SK-LMS-1 human leiomyosarcoma	Cytotoxicity/tumor inhibition, direct contact/adhesion/binding to cell membrane or receptors
JAC	HT29 human colon cancer	Cytotoxicity/tumor inhibition
	Adenomatous polyps and colorectal neoplasms	Direct contact/adhesion/binding to cell membrane or receptors
LCA	H3B human hepatoma	Cytotoxicity/tumor inhibition
	Merkel cell skin carcinomas	Direct contact/adhesion/binding to cell membrane or receptors
MAL	H3B human hepatoma, Jar human choriocarcinoma, and ROS rat osteosarcoma	Cytotoxicity/tumor inhibition
ML-I	Molt-4 human lymphocyte	Cytotoxicity/tumor inhibition
	Molt-4 human lymphocyte	Ribosome binding/inhibition of protein synthesis, direct contact/adhesion/binding to cell membrane or receptors, internalization of lectin, apoptosis
ML-II	Malignant melanoma	Cytotoxicity/tumor inhibition
	Molt-4 human lymphocyte	Cytotoxicity/tumor inhibition
	U937 human monoblastic leukemia	Apoptosis, activation of extracellular signal-regulated kinases, activation of p38 mitogen-activated protein kinase, alteration of cellular signaling pathways
	U937 human myeloleukemic	Apoptosis, activation of the caspase cascade
	Jurkat T, RAW 264.7, HL-60, DLD-1, primary acute myelocytic leukemic	Apoptosis
	Malignant melanoma	(Cytotoxicity/tumor inhibition)

Adaptado de Mejía e Prisecaru, 2005.

## 1.6 Bioaplicações das lectinas

De todas as lectinas presentes na natureza, as lectinas de plantas, devido ao facto de a sua purificação, ao nível dos órgãos de reserva, ser simples, são a família mais utilizada, na área da biotecnologia e das bioaplicações.

As lectinas são muito usadas nas pesquisas biotecnológicas e biomédicas pela sua capacidade de se ligarem especificamente a hidratos de carbono. A título de exemplo, a lectina da semente da *Salvia bogotensis* tem afinidade para o antigénio Tn, normalmente encontrado em células tumorais (Vega & Perez, 2006). A especificidade das lectinas, permite que sejam utilizadas na vertente clínica, sendo utilizadas em marcação fluorescente para visualização *in loco* (imagiologia), caracterização bioquímica de biofilmes bacterianos, estimulação de macrófagos para inibição da proliferação de células leucémicas, e até mesmo, indução da resposta mitógena. Kaur e colaboradores (2005), purificaram uma lectina do rizoma *A. donax* e concluíram que esta tem atividade antiproliferativa para as linhas de células tumorais humanas (HT29, T47D, SiHa, SW620, SK-N-SH, Hep2, PC3 e OVCAR5), tal como atividade mitógena em células mononucleares periféricas. Esta propriedade que as lectinas têm de se ligarem especificamente a recetores glicosilados das membranas de linhas celulares malignas, por reconhecimento das anomalias glicómicas introduzidas, faz das lectinas futuras ferramentas bioadesivas na distribuição de fármacos (Gabor *et al.*, 2001).

Devido às suas propriedades, as lectinas têm sido utilizadas em diversos campos da saúde como a fisiologia, a bioquímica e as ciências biomédicas. A capacidade que as lectinas têm de reconhecer células tumorais, de diferentes etiologias, abre assim mais um campo de estudo e aplicação das lectinas, a oncologia.

O painel de aplicação das lectinas, é variado e abrangente, se tivermos em consideração que o glicoma celular, de cada célula, de cada órgão funciona com uma impressão digital, e, que as lectinas são ferramentas prontas a fazerem a sua descodificação. Para três áreas distintas, seguem-se exemplos de aplicação das lectinas:

**Medicina** – deteção de doenças relacionadas com alterações de síntese dos glicanos; estudos da malignidade (quantificação e discriminação de aberrações glicómicas da superfície celular); terapêutica antitumoral; marcador celular para diagnóstico; tipagem sanguínea, deteção e quantificação de biomarcadores de despiste etiológico de diferentes patologias.

**Biologia Celular** - Fracionamento de populações celulares; substrato para estudos de agregação e adesão celular; avaliação dos mecanismos envolvidos na glicosilação correcta (mediante lectinas resistentes a variantes celulares).

**Bioquímica** – Purificação de lectinas associadas a glicoconjugados; deteção de epítomos definidos para glucidos de glicoconjugados; caracterização de glicanos; análise glicómica; quantificação de actividades de glicosiltransferases/glicosidases por lectinas, com

base na detecção de produtos formados pela reação enzimática; quantificação de lectinas associadas a glicoconjugados reativos (Rüdiger & Gabius, 2001).

Quanto à aprovação de novos compostos, por exemplo, novos fármacos, é fundamental que se façam ensaios de toxicidade, que têm que ser efetuados em sistemas *in vitro* e *in vivo*, com o objetivo de determinar a concentração na qual uma determinada substância é capaz de produzir resposta biológica. Nas tabelas seguintes constam alguns dos efeitos inibitórios de algumas lectinas de plantas em diversas células malignas *in vitro* (tabela 3 e 4) e *in vivo* (tabela 5).

**Tabela 3-** Efeitos inibitórios de lectinas em diversas células malignas *in vitro*

Lectins	Tumor cells	Type of effect
ML-III	Molt-4 human lymphocyte	Cytotoxicity/tumor inhibition
	Malignant melanoma	(Cytotoxicity/tumor inhibition)
NPA	H3B human hepatoma	Cytotoxicity/tumor inhibition
PHA	SK-MEL-28, HT-144 and C32 human melanoma	(Cytotoxicity/tumor inhibition)
	Hs729 (HTB-153) human rhabdomyosarcoma and SK-UT-1 and SK-LMS-1 human leiomyosarcoma	Cytotoxicity/tumor inhibition, (direct contact/adhesion/binding to cell membrane or receptors)
	SP2 myeloma, Lox-2 Ab-producing hybridoma	Cell agglutination/aggregation
	B-DLCL human large B-cell lymphoma	Direct contact/adhesion/binding to cell membrane or receptors
PNA	SW1222 and HT29 human colon cancer	Cell agglutination/aggregation
	Human melanoma cells	Direct contact/adhesion/binding to cell membrane or receptors
	SK-UT-1 (HTB-114) human leiomyosarcoma	Cytotoxicity/tumor inhibition, direct contact/adhesion/binding to cell membrane or receptors
	SK-LMS-1 (HTB-88) human leiomyosarcoma	Direct contact/adhesion/binding to cell membrane or receptors
RBA	Human monoblastic leukemia U937	Cytotoxicity/tumor inhibition, apoptosis, chromatin condensation/nuclear fragmentation/DNA release, externalization of membrane phosphatidylserine, DNA ladder formation, G2/M phase cell cycle arrest
Ricin	BEL7404 hepatoma	Apoptosis, upregulation of Bak
Ricin A	Human A431 epidermoid	Ribosome binding/inhibition of protein synthesis
Saracin	Human T-lymphocytes	Apoptosis, induction of IL-2 secretion
SNA	Surgically removed human colon cancer cells	Direct contact/adhesion/binding to cell membrane or receptors
STL	H3B human hepatoma, Jar human choriocarcinoma, and ROS rat osteosarcoma	Cytotoxicity/tumor inhibition
TGF- $\alpha$ -rec Ricin A	A431 human epidermoid cancer	Cytotoxicity/tumor inhibition
TGF- $\alpha$ -rec Ricin A	H226Br brain metastatic var. human NSCLC squamous cells	(Cytotoxicity/tumor inhibition)
TML	H3B human hepatoma, Jar human choriocarcinoma, and ROS rat osteosarcoma	Cytotoxicity/tumor inhibition
UDA	Merkel cell skin carcinomas	Direct contact/adhesion/binding to cell membrane or receptors
VAA	Murine melanoma and HeLa human cervical cancer	Cytotoxicity/tumor inhibition
	A549 human lung carcinoma	Non-apoptotic G1-phase accumulation mechanisms
VCA	SK-Hep-1 (p53+), Hep 3B (p53-) hepatic cancer	Apoptosis, downregulation of Bcl-2/upregulation of Bax, downregulation of telomerase activity
	Human breast cancer	Increased TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ and/or IL-4 secretion, Th1- shift in the Th1/Th2 balance
VFA	LS174T human colon cancer	Cytotoxicity/tumor inhibition, stimulation of morphological differentiation, reduction of malignant phenotype, cell agglutination/aggregation
	SW1222 and HT29 human colon cancer lines	Cytotoxicity/tumor inhibition, cell agglutination/aggregation
WGA	Human pancreatic carcinoma	Direct contact/adhesion/binding to cell membrane or receptors, internalization of lectin, apoptosis, chromatin condensation/nuclear fragmentation/DNA release
	U937 human monoblastic leukemia	Cytotoxicity/tumor inhibition, apoptosis, G2/M phase cell cycle arrest
	LS174T, SW1222, and HT29 human colon cancer lines	Cytotoxicity/tumor inhibition, cell agglutination/aggregation
	H3B human hepatoma, Jar human choriocarcinoma, and ROS rat osteosarcoma	Cytotoxicity/tumor inhibition

Adaptado de Mejía e Prisecaru, 2005.

**Tabela 4** - Efeitos inibitórios de lectinas em diversas células malignas *in vitro* (continuação).

Lectins	Tumor cells	Type of effect
	Adenomatous polyps and colorectal neoplasms	Direct contact/adhesion/binding to cell membrane or receptors
	Merkel cell skin carcinomas	Direct contact/adhesion/binding to cell membrane or receptors
	SK-MEL-28, HT-144, and C32 human melanoma lines	Cytotoxicity/tumor inhibition
	Hs729 (HTB-153) human rhabdomyosarcoma	(Direct contact/adhesion/binding to cell membrane or receptors)
	SK-UT-1 and SK-LMS-1 human leiomyosarcoma	Cytotoxicity/tumor inhibition, direct contact/adhesion/binding to cell membrane or receptors
	AR42J rat pancreatic cell line	Cytotoxicity/tumor inhibition

\*NOTE: Parentheses ( ) indicate weak effects.

Adaptado de Mejía e Prisecaru, 2005.

**Tabela 5** - Efeitos inibitórios de lectinas em diversas células malignas *in vivo*.

Lectins	Animal model	Type of effect
Anti-CD64-Ricin-A	Acute human myeloid leukemia in NOD/SCID mice	Cytotoxicity/tumor inhibition
Con A <sup>a</sup>	B16 melanoma cells in mice	Cytotoxicity/tumor inhibition
rML	Human ovarian cancer in SCID mice	Cytotoxicity/tumor inhibition
	Chemically induced urinary bladder cancer in mice	Cytotoxicity/tumor inhibition, lower expression of IL-10
	Nitrosourea-induced urinary bladder cancer in rat	Cytotoxicity/tumor inhibition, direct contact/adhesion/binding to cell membrane or receptors, lower expression of IL-10
	Murine melanoma in mice	Cytotoxicity/tumor inhibition, inhibition of metastasis
PHA	Non-Hodgkin's lymphoma in mice	Cytotoxicity/tumor inhibition, competition for polyamines
	NMRI mice injected with Krebs II lymphosarcoma	Cytotoxicity/tumor inhibition
	MCF7 and T47D metastatic human breast cancer lines, SCID mice	Direct contact/adhesion/binding to cell membrane or receptors
	HBL100, BT20, and HS578T human breast cancer lines, SCID mice	(Direct contact/adhesion/binding to cell membrane or receptors)
	HT29 highly metastatic colon cancer, SCID mice	Direct contact/adhesion/binding to cell membrane or receptors
	CACO <sub>2</sub> colon cancer, SCID mice	Direct contact/adhesion/binding to cell membrane or receptors
	HT29 highly metastatic colon cancer, SCID mice	Direct contact/adhesion/binding to cell membrane or receptors
VAA	Urinary bladder carcinoma MB49 in mice	Cytotoxicity/tumor inhibition, reduction of malignant phenotype, (inhibition of metastasis)
VCA	C57BL6 mice with B16-BL6 melanoma cells	Cytotoxicity/tumor inhibition, apoptosis, inhibition of angiogenesis, inhibition of metastasis
WGA <sup>b</sup>	Colon carcinoma in F-344 rats	Cytotoxicity/tumor inhibition
	Human colorectal cancer	Inhibition of metastasis, better prognosis/longer survival times

\*NOTE: Parentheses ( ) indicate weak effects.

<sup>a</sup>Con A was chemically modified (PEG-Con A).

<sup>b</sup>A whole fermented wheat extract was used.

Adaptado de Mejía e Prisecaru, 2005.



## 2. Glicosilação celular

### 2.1 Glicoma celular e glicosilação

Os glicanos são moléculas que existem em diferentes isoformas, formando várias estruturas, que vão desde conjugados de açúcares simples a muitas outras moléculas biológicas, como os lípidos e as proteínas que se encontram também à superfície celular (Patwa *et al.*, 2010). Os glicanos estão associados tanto a processos fisiológicos como patológicos (por exemplo invasão celular e metastização) (Hakomori, 1996).

Os glicoconjugados são uma classe de biomoléculas na qual estão incluídas as glicoproteínas, glicolípidos e proteoglicanos. Alterações a nível da glicosilação de glicoproteínas e de glicolípidos pode estar associado a processos tumorais. (figura 5).

A glicosilação é o processo de modificação pós-traducional de proteínas mais frequente, estruturalmente distinto, mas que está relacionado com vários processos essenciais à sobrevivência celular, como por exemplo a sinalização célula-célula, a solubilização proteica, a interação entre ligandos e recetores, a divisão celular, bem como a morte celular, (Yang *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2014). Sendo assim, alterações no processo de glicosilação leva a perfís de aberração glicómica, que muitas das vezes pode estar associado ao aparecimento de cancro (Sunderic *et al.*, 2015). Neste processo estão envolvidos pelo menos 8 aminoácidos diferentes, com o mínimo 41 ligações químicas distintas na ligação proteína- glicano (Huang *et al.*, 2014).

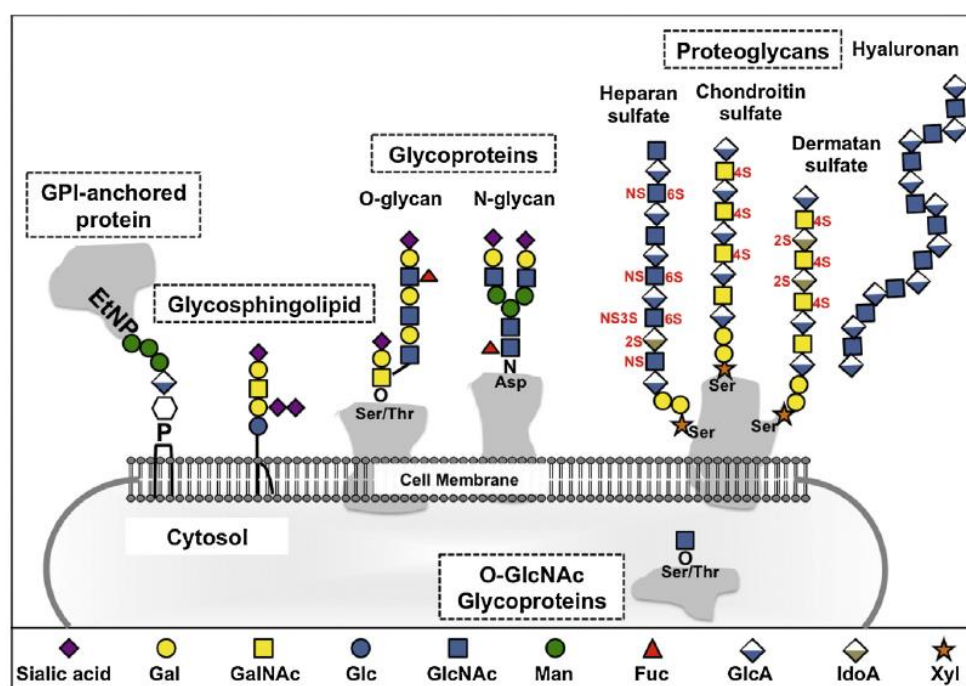
A glicosilação consiste numa modificação pós-traducional de proteínas ou lipídios ancorados na membrana, que sofrem esta alteração quando atravessam o lúmen do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi. A maquinaria envolvida neste processo é fundamental, uma vez que é reponsável pela montagem do vasto repertório de estruturas de glicanos, denominado de glicoma. A atividade das enzimas glicosiltransferases e glicosidases é fundamental neste processo. Estas glicosiltransferases usam apenas 1 estrutura de nucleótidos formando uma ligação específica entre um precursor glicano e um monossacárido, de modo a formar este imenso repertório de glicanos. (Faheina-Martins *et al.*, 2012; Rabinovich & Croci, 2012; Decker *et al.*, 2014). A presença de locais de glicosilação N ou O na estrutura da proteína, vai condicionar a natureza e extensão da glicosilação de uma determinada proteína. Sendo assim existem 2 tipos de glicosilação: a N-glicosilação e a O-glicosilação.

A N-glicosilação consiste numa cadeia de oligossacáridos “N-linked” à aspargina numa sequência de 3 péptidos: Asn-X-Ser/Thr, sendo que o X corresponde a qualquer aminoácido com exceção da prolina, seguida de um processo de adição/remoção de glucose que ocorre no retículo endoplasmático, contribuindo para o enovelamento proteico. O terceiro

aminoácido pode ser também a serina (Faheina-Martins *et al.*, 2012; Decker *et al.*, 2014). Estes resíduos podem ser libertados da proteína enzimaticamente por ação da N-glicosidases (PNGases).

A O-glicosilação corresponde à ligação de um O-glicano a um resíduo de serina ou treonina (Reis *et al.*, 2010), sendo que não existe nenhuma enzima equiparada às PNGases, ou seja que permita a libertação dos resíduos. Sendo assim, a única forma de reverter o efeito da ligação O-glicano é através de métodos químicos como a eliminação (corte) da ligação  $\beta$  (Faheina-Martins *et al.*, 2012).

Quanto às lectinas, tendo em conta que estas são específicas para glicanos podem ser utilizadas para decodificar a aberração glicómica.



**Figura 5** – Representação das várias classes de glicoconjugados expressos em células humanas.

Adapted from Padler-Karavani, 2014

## 2.2 Alterações anormais da glicosilação

Uma das principais alterações associadas à glicosilação em células tumorais, dá-se ao nível do perfil da superfície celular (Lahm *et al.*, 2004). Estas aberrações glicómicas são acompanhadas por alterações estruturais que vão afetar as propriedades antigénicas, adesivas, capacidade de invasão de tecidos adjacentes e de metastização das células tumorais (Kobayashi *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2010). Tudo isto é de fácil compreensão à luz de estudos que nos mostram que a maioria dos doentes acaba por falecer devido a processos metastizados e não devido ao tumor primário (Hauselmann & Borsig, 2014). O processo de transformação maligna implica alteração genéticas a nível celular, que resulta em mutações

ao nível dos proto-oncogenes, e dos genes supressores de tumor, sendo que vai ocorrer um aumento de clones tumorais distintos (Hanahan & Weinberg, 2011). Estas células malignas têm a capacidade de se dissociarem dos tumores, causando degradação da matriz extracelular, invasão, adesão e metastização em órgãos longínquos (Hauselmann & Borsig, 2014).

As alterações das vias normais da glicosilação resultam em alterações da expressão de glicanos, ocorrendo este fenómeno devido a:

- aumento ou diminuição da expressão de glicosiltransferase a nível epigenético, a nível da transcrição, e no pós-transcrição (Kannagi *et al.*, 2008; Hatano *et al.*, 2012; Jun *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013);
- alterações da atividade da glicosidase (Miyagi *et al.*, 2004; Miyagi *et al.*, 2012);
- alteração da expressão do glicoconjugado aceitador (Dennis *et al.*, 1987);
- disfunção do aparelho de Golgi (Moremen *et al.*, 2012).

Uma das glicosiltransferases da família das sialtransferases é a  $\beta$ -galactosido  $\alpha$ -2,6-sialtransferase (ST6 Gal I), esta enzima é fundamental na síntese do ácido siálico com glicoproteínas e glicolípidos (Park & Lee, 2013). Esta é uma das enzimas, que se têm estudado, concluindo-se que está associada ao desenvolvimento de carcinoma colorretal, sabendo ainda que provavelmente o aumento da sialtransferase leva ao aumento da ligação  $\alpha$ -2,6, sendo que estes aumentos estão correlacionados com o aparecimento de metastases (Park & Lee, 2013).

### **2.2.1 Alterações das ramificações N- e O- glicanas**

O cancro, muito rudimentarmente, corresponde a uma proliferação anormal de células. Este está associado a alterações na expressão genética, que levam a que a célula se transforme numa célula maligna, com a capacidade de afetar células/tecidos vizinhos, sendo que esta alteração beneficia a célula maligna, mais concretamente, permitindo a expressão descontrolada de sinais de crescimento, logo tornando insignificantes os efeitos dos genes supressores de tumor.

Dentro das alterações mais frequentes em situações de carcinoma destaca-se o aumento de N-glicanos e de ácido siálico na célula, havendo ainda uma produção anormal de mucina (Hauselmann & Borsig, 2014).

#### **a) Ramificação N-glicanos**

Os N-glicanos, a sua síntese e os seus produtos estão intimamente ligados a mecanismos de progressão tumoral. Alguns dos mecanismos que podem levar às alterações bioquímicas e estruturais são: o comprimento das cadeias de N-glicanos ou o número de locais de N-glicosilação, que vai interferir diretamente com os mecanismos de adesão célula-célula (De Freitas Junior & Morgado-Diaz, 2016); a excessiva regulação de  $\alpha$ -2,6 lactosamina

sialilada (Si6LacNAc), responsável pela resistência terapêutica no carcinoma colorretal (De Freitas & Morgado-Diaz, 2016); aumento da poli-*N*-acetilactosamina que contém glicanos (Varki *et al.*, 2009); alterações na semi-vida dos recetores de fatores de crescimento da superfície celular (Varki *et al.*, 2009); aumento da polifucosilação de cadeia externa e da produção de antígeno Lewis sialil X (Varki *et al.*, 2009).

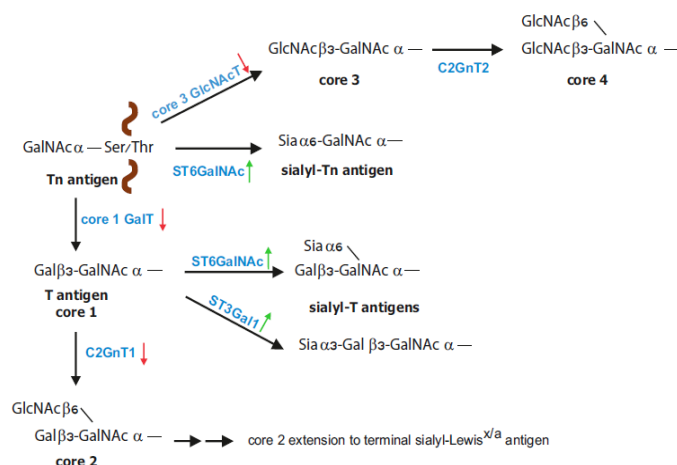
O aumento da expressão tumoral deve-se ao aumento das ramificações  $\beta$ -1,6 dos N-glicanos, o que leva a um aumento da expressão de UDP-GlcNAc:*N*-glicano\_GlcNAc transferase V (GlcNAcT-V). Os mecanismos da carcinogénese (por exemplo o mecanismo químico) pode estar relacionado com o aumento da expressão do gene de transcrição *MGAT5*, que afeta alterações na expressão da enzima GlcNAcT-V (Varki *et al.*, 2009; Hauselmann and Borsig, 2014)

### b) Ramificação O-glicanos

A expressão anormal de O-glicanos em células tumorais resulta em maior capacidade de adesão, invasão e metastização (Balduş *et al.*, 2004).

No tecido normal a mucina é apenas expressa no domínio apical, sendo também secretada no lumen do órgão. Quando há alteração da célula, a mucina passa a estar expressa em todos os domínios celulares, fazendo com que as mucinas solúveis possam entrar no espaço extracelular (como por exemplo o plasma sanguíneo). Nestes casos, as mucinas muitas das vezes parecem ser as grandes transportadoras de estruturas com glicosilação alterada, levando a expressão de antígenos Tn e T, podendo assim provocar respostas por parte do sistema imunitário.

Tendo em conta que estas estruturas são raras em condições normais, há uma correlação entre a agressividade do tumor e a quantidade de antígeno presente, quanto mais antígeno mais agressivo será o tumor (Varki *et al.*, 2009).



**Figura 6 - Biossíntese de O-glicanos**

Adaptado de Hauselmann e Borsig, 2014

### 3. Cancro colorretal

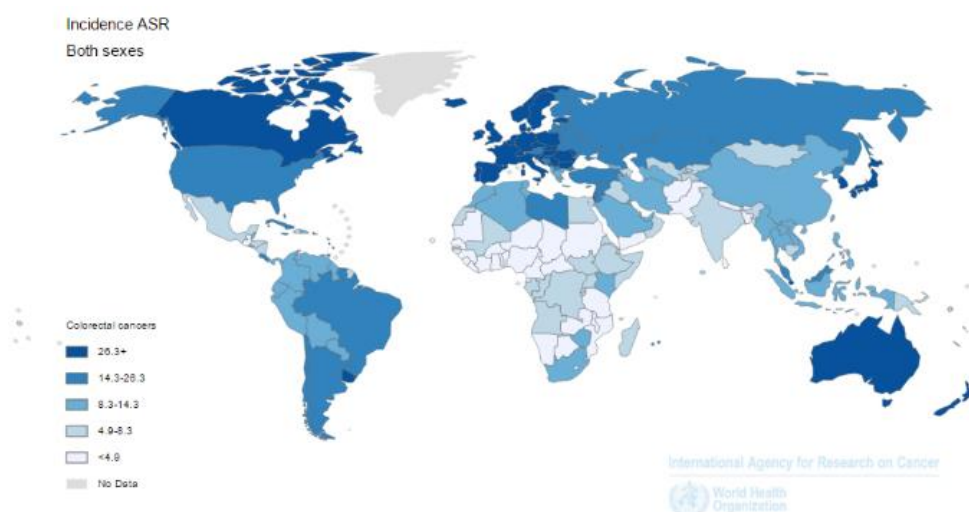
#### 3.1 Carcinoma colorretal

##### 3.1.1 Epidemiologia

Em 2015, 8,8 milhões de pessoas morreram de cancro em todo o mundo. Atualmente o cancro é considerado um problema de saúde pública tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento (Jemal *et al.*, 2011).

O cancro colorretal é o 3º cancro mais comum a nível mundial, sendo o 2º com maior taxa de mortalidade. Quanto ao diagnóstico, é o 3º mais diagnosticado no homem e o 2º mais diagnosticado na mulher. Os últimos dados estatísticos emitidos pela OMS são referentes ao ano de 2012, sendo que nesse ano surgiram 1.361 milhões de novos casos de cancro colorretal e 694,000 mortes relacionadas com o mesmo (WHO, 2014; Ferlay *et al.*, 2015).

Em Portugal, em 2014, era o 2º cancro com maior incidência em ambos os sexos (WHO, 2014).



**Figura 7** - Incidência geográfica, em 2012, do carcinoma colorretal a nível mundial.

Adaptado de Ferlay *et al.*, 2015

Os fatores de risco para desenvolver cancro colorretal, podem dividir-se em 2 grupos:

Fatores não modificáveis – fatores que não são alteráveis por agentes externos, como a idade, fatores hereditários, história pessoal de doença inflamatória do cólon (por exemplo colite ulcerosa), de cancro colorretal, e história de pólipos adenomatosos (Jorgensen *et al.*, 2015).

A colite ulcerosa, é uma doença inflamatória crónica do intestino grosso, sendo que a inflamação pode originar zonas de ulceração. Esta patologia afeta tanto o sexo masculino

como o feminino, sendo o principal sintoma as retorragias, surgindo normalmente diarreias mucosas e sanguinolentas, por vezes com pús. Além dos sintomas cardinais, pode ainda surgir febre, anemia e perda de peso. É de salientar que como doença crónica, os doentes com colite ulcerosa sofrem períodos de agudização e de remissão da doença. Quanto à causa desta patologia, está discriminado que podem ser causas imunológicas ou causas ambientais (como a alimentação), estando associado a este tipo de patologia uma ligeira tendência hereditária. A grande consequência da colite ulcerosa é o carcinoma colorretal, uma vez que, tal como o carcinoma colorretal, na colite há aberração glicómica.

Fatores ambientais – fatores que são alteráveis, como os hábitos alimentares e de exercício físico, a obesidade, o consumo de tabaco e álcool (Haggar *et al*,2009).

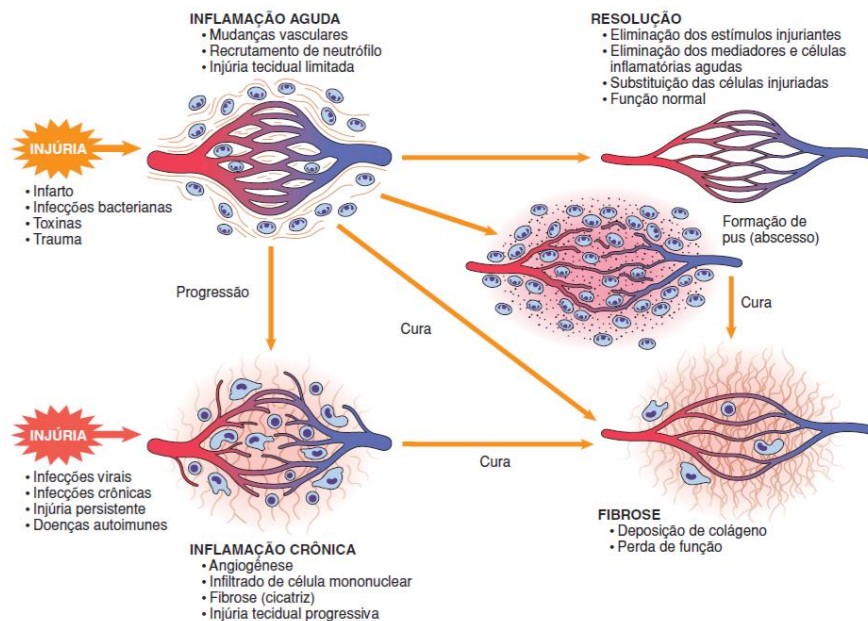
O cancro colorretal, é originário das células epiteliais do cólon ou do reto, sendo que está associado a um processo evolutivo de vários estádios, que podem começar com pequenas lesões da mucosa ou pequenos tumores benignos evoluindo, por vezes, para situações malignas (carcinoma). Sendo assim, este processo sequencial divide-se em IV estádios, sendo que no estadio IV já há metástases à distância (Watson, 2006).

### **3.1.2 Inflamação**

A inflamação é um processo essencial á sobrevivência do organismo, basicamente trata-se de uma resposta protetora. Sendo assim, a inflamação corresponde a um conjunto de reações complexas, que pode ocorrer em qualquer tecido do nosso organismo, e que consiste fundamentalmente em respostas dos vasos sanguíneos e resposta leucocitária. No organismo humano os principais mediadores de inflamação são proteínas plasmáticas os leucócitos (linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos), destacando-se também o papel das células *Natural Killer*, dos macrófagos, das células dendríticas e dos fagócitos. Esta resposta é extremamente coordenada, de modo a que reações dos vasos sanguíneos, reações leucocitárias e reações plasmáticas estejam sincronizadas, para que se alcance o objetivo pretendido.

É também de frisar que, consoante a natureza e duração do estímulo, e a efetividade da reação inicial em irradiar o estímulo ou os tecidos comprometidos, a inflamação pode ser considerada crónica ou aguda:

- a) inflamação aguda: é uma inflamação de início rápido e duração curta (algumas horas até poucos dias). Neste tipo de inflamação podemos encontrar exsudação de fluidos e proteínas plasmáticas, ou seja, formação de edema, migração de leucócitos (fundamentalmente neutrófilos), aumento do fluxo sanguíneo (figura 8). Quando, neste tipo de processo inflamatório se consegue eliminar o agente etiológico, há redução da reação, no entanto, se estes mecanismos falharem, podemos passar a ter uma inflamação do tipo crónica. São exemplos de reações inflamatórias agudas: infeções bacterianas; toxinas, trauma.



**Figura 8** - Resultados da inflamação aguda ou crônica: cicatrização por fibrose.

Adaptado de Robbins & Cotran, 2010

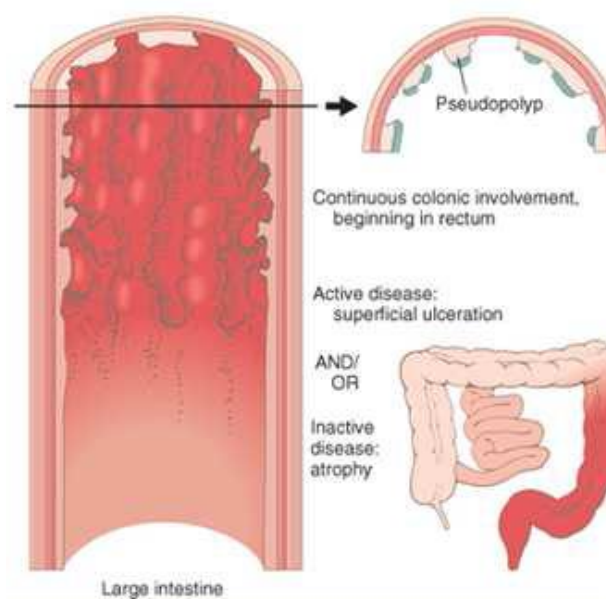
- b) inflamação crônica: é muitas vezes derivada de um processo inflamatório agudo mal resolvido, ou então pode ter um início insidioso. Ocorre normalmente devido a infeções persistentes por microrganismos difíceis de eliminar, doenças inflamatórias imunomediadas, exposição prolongada a agentes potencialmente tóxicos (exógenos ou endógenos). Esta é uma inflamação de longa duração, caracterizada por presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e destruição tecidual. Mais uma vez, a inflamação só é terminada com a eliminação do agente etiológico que esta a causar o processo inflamatório. São exemplo de processos inflamatórios crônicos a artrite reumatóide, a aterosclerose, a tuberculose a fibrose pulmonar, a Doença de Crohn e a colite ulcerosa, estando também associada a progressão tumoral e a doenças degenerativas como a Doença de Alzheimer (Robbins & Cotran, 2010).

As doenças inflamatórias do intestino, são doenças inflamatórias crônicas idiopáticas, sendo patologias associadas à inflamação crônica do epitélio intestinal, danificação da mucosa, e ulceração recorrente da mesma (Pithadia & Jain, 2011). Quanto à



sintomatologia tanto há sintomatologia intestinal, como extra-intestinal, normalmente relacionadas a processos de stress oxidativo, inflamação e processos auto-imunes (Mowat *et al.*, 2011; Pawar *et al.*, 2011).

Dentro das doenças inflamatórias do intestino, destacamos a colite ulcerosa (figura 9), patologia associada a inflamação crónica da mucosa e sub-mucosa do colón, que pode afetar o reto (Silverberg *et al.*, 2005; Mowat *et al.*, 2011). Por vezes, alguns doentes, apresentam também inflamação da porção terminal do íleo, tornando o diagnóstico mais complexo devido a proximidade à doença de Crohn (Kornbluth & Sachar, 2010). Em biopsia intestinal muitas vezes encontram-se granulomas.



**Figura 9** - Alterações da mucosa intestinal características da colite ulcerosa.

Adaptado de Tresca, 2015

A colite ulcerosa pode ser classificada de acordo com extensão da doença e a sua severidade. Com base na classificação de Montreal, que divide esta doença em 3 subtipos (proctite ulcerosa, colite ulcerosa distal e colite ulcerosa extensa), de acordo com a extensão máxima de inflamação observada em colonoscopia, devido à sua relação com o risco de aparecimento de complicações como a dilatação do colón e o carcinoma (Silverberg *et al.*, 2005).

### 3.1.3 Diagnóstico

Normalmente o carcinoma colorretal é assintomático nos primeiros anos, sendo este o grande problema associado a este tipo de cancro, muitas das vezes este carcinoma é diagnosticado no estadio IV, fazendo com que haja uma diminuição de cerca de 5 anos de sobrevivência, nestes casos, a terapêutica aplicada é, normalmente paliativa, e não curativa (Holst *et al.*, 2016). Infelizmente, não existe nenhum marcador precoce do carcinoma



colorretal. No entanto, segundo a OMS, em Portugal, já existem métodos de deteção precoce, não são biomarcadores, mas sim outros testes que permitem um diagnóstico precoce do carcinoma colorretal, como a pesquisa de sangue oculto nas fezes, análise que deve ser feita anualmente por todos os indivíduos acima dos 50 anos inclusive, testes imunológicos às fezes e a colonoscopia (WHO, 2014).

Quanto ao diagnóstico analítico, utiliza-se o antígeno carcinoembrionário (CEA), este marcador é produzido no trato gastrointestinal a nível fetal, e no lúmen das células do epitélio do colón nos adultos. Este marcador é uma glicoproteína, que na presença de carcinoma perde a capacidade de expressão de uma proteína que é responsável pela sua polaridade, levando a que ocorram glicosilações aberrantes.

### **3.1.4 Tratamento**

Quanto ao tratamento, dentro da terapia curativa, normalmente, o primeiro passo adotado é a receção cirúrgica do tumor, seguida de terapia com compostos citotóxicos e com agentes alvo (quimioterapia) que pode ser oral ou endovenosa, consoante o estadio da doença, entre outros fatores. Em alguns casos aplicam-se tratamentos de radioterapia, sendo que a radioterapia é muitas vezes utilizada com o intuito de aumentar as hipóteses de sobrevivência (Stein *et al.*, 2011).

Para os casos mais avançados, estadio IV, existe, tratamentos paliativos, com o intuito de fazer o doente sentir-se mais confortável, não se tratando a doença e, destacando-se o uso da morfina (WHO, 2014).

É importante salientar que, apesar de todos os avanços médicos e tecnológicos a taxa de reincidência de cancro é de 30 % (Marin *et al.*, 2012).

### **3.1.5 Caraterísticas da aberração glicómica nas células do carcinoma colorretal**

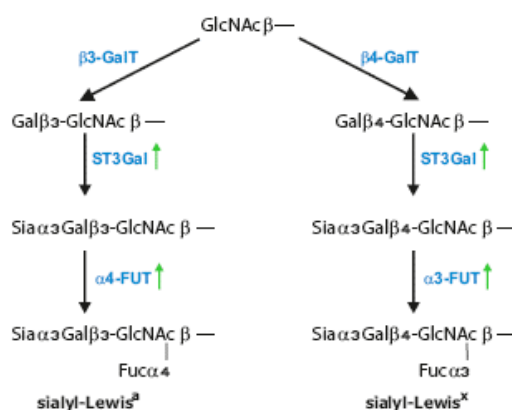
Quando se estudam tecidos tumorais são encontradas alterações, nomeadamente a nível dos glicanos da superfície celular, mais concretamente dos *N*-oligosacáridos, nas ligações  $\beta$ -1,6-GlcNAc, que nestes tecidos estão mais ramificadas, sendo este tipo de alteração característico de fases iniciais da formação tumoral, relacionada com oncogenes. O aumento da ramificação  $\beta$ -1,6 ocorre devido ao aumento da atividade da  $\beta$ -1,6-*N*-acetilglucosaminiltransferas (GlcNAc-TV), ou MGAT5, este aumento leva a uma sobreexpressão do seu gene, gene este associado à transformação maligna (Park *et al.*, 2013). Podem ocorrer também alterações ao nível do aumento da siliação  $\alpha$ -1,2, no complexo de Golgi, este aumento pode estar associado à metastização destas células.

Normalmente, nas células tumorais há alterações a nível da estrutura e da quantidade de glicoproteínas. É de frisar a importância da mucina, uma vez que esta é a componente

proteica maioritária do muco que envolve o epitélio gastrointestinal, neste caso há alterações ao nível dos O-glicanos (Crocker, 2005). No colón normal existem diversas camadas de mucina com uma imensa variedade de estruturas O-glicano, e que exibem atividade enzimática diferenciada, esta atividade sintetiza estruturas comuns aos 1-4 cores. No carcinoma colorretal está aumentada a expressão de várias *N*-acetilgalactosiltransferases (ppGalNAcTs), que são responsáveis pela síntese do antígeno T e Tn, bem como, pelo início da O-glicosilação (Shibao *et al.*, 2002).

Quanto aos antígenos T e Tn, facilmente se conclui que estes são indicadores de mau prognóstico, fazendo a associação entre a expressão do gene ppGalNAc-T3, a probabilidade da sobrevivência ao fim de 5 anos e a diferenciação histopatológica dos tumores. O aumento destes antígenos, normalmente está presente em estadios mais avançado (invasividade, proliferação acentuada e metastização) (Itzkowitz *et al.*, 1990). O antígeno T (core 1) é característico do carcinoma colorretal, em contraste com a mucosa normal do colón que exhibe maioritariamente estruturas core 3.

Quanto ao ácido siálico, antígenos SLex e SLea, células que expressam este tipo de antígenos conseguem aderir a células epiteliais, provavelmente devido a ação de seletinas ELAM, moléculas indutivas da adesão de neutrófilos. O aumento de SLex está condicionado pelo aumento da atividade das  $\alpha 3$ -sialiltransferases, a sua síntese é controlada pela  $\alpha 3$ -Fuc-transferase IV (figura 10), que em tecidos tumorais está claramente aumentada (Kudo *et al.*, 1998).



**Figura 10** - Esquema da síntese do antígenos SLea.

Adaptado de Häuselmann & Borsig, 2014.

### 3.1.6 Progressão e alterações moleculares no carcinoma colorretal

O carcinoma colorretal é resultado de alterações genéticas e epigenéticas que levam à transformação de epitélio normal em adenomas e posteriormente em adenocarcinomas (Cooper *et al.*, 2010). Neste tipo de processos estão envolvidas 3 vias moleculares:

instabilidade genética e metilações de DNA aberrantes devido a mutações (MMR); inativação mutagénica de genes supressores tumorais; super ativação de vias oncogénicas (Grady e Carethers, 2008).

A metastização ocorre no estadio IV, corresponde à fase terminal do processo de evolução tumoral, nesta fase há migração, invasão, resistência e extravasação para o pulmão e/ou para o fígado. Esta fase está relacionada maioritariamente com 2 vias de sinalização, o fator de crescimento vascular (VEGF) e o recetor do fator de crescimento da epiderme (EGFR) (Aghagolzadeh & Radpour, 2016).

Quanto às alterações fenotípicas estas, normalmente ocorrem na *N*-glicosilação, os *N*-glicanos são extremamente importantes neste processo uma vez que estão envolvidos em diversos mecanismos celulares (metabolização, sinalização, adesão celular, interações célula-matriz, processos de invasão e metastização, bem como de crescimento), alterações nestes mecanismos beneficiam a progressão da doença (De Freitas & Morgado-Diaz, 2016).

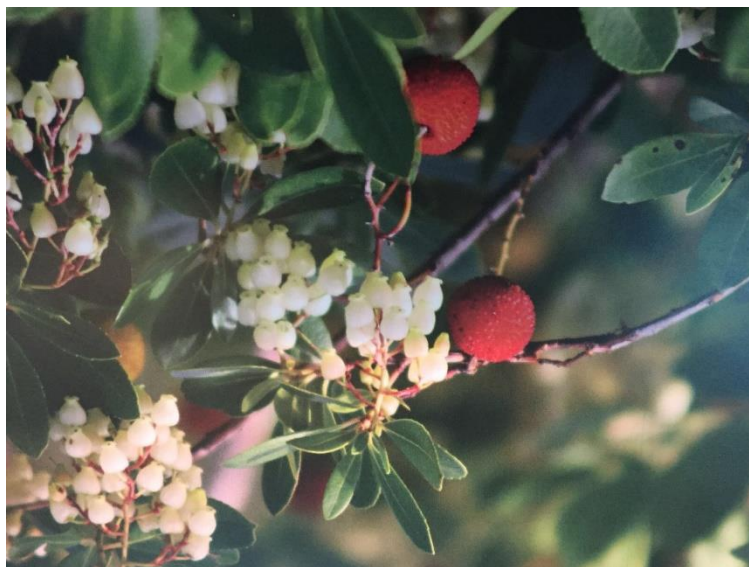
#### **4. Flora Mediterrânica: *Arbutus unedo*, à descoberta de novas lectinas**

O *Arbutus unedo* é um arbusto da família da Ericacea (família das dicotiledóneas), esta família é constituída principalmente por arbustos de folha simples (Caixinhas, 1987). Este arbusto é característico de todo o matorral da região mediterrânica, mais concretamente de países como Portugal, Espanha, França, Sul de Itália e Grécia, sendo que é possível encontrá-lo até altitudes de 1200 m, sendo 3 espécies características desta zona: *A.unedo*, *A.andrachne* e *A.andrachnoides* (sendo o terceiro provavelmente trata-se de um híbrido dos 2 primeiros) (Prada & Arizpe, 2008). Em Portugal este arbusto é mais encontrado nas zonas das colinas graníticas ou calcárias como na Arrábida, Grândola, Cercal, Monchique, Espinhaço do Cão, Caldeirão, e outros locais com características semelhantes (Neto, 2007) (figura 11).

A espécie *A.unedo* é diplóide, sendo que  $2n=26$ , que se reproduz sexualmente seminal ou vegetativamente através da raiz. Quanto às suas folhas, estas são típicas de vegetação esclerófila, folhas pequenas, espessas, coriáceas, estas folhas apresentam uma dureza característica que funciona como mecanismo de defesa para que em ambientes secos a folha não murche (Alves *et al.*, 2012). As folhas são persistentes, brilhantes, opostas, de aspeto resistente, em forma elíptica, têm uma pequena ponta saliente com nervuras.

Quanto aos compostos bioativos do medronheiro, o fruto contém compostos antioxidantes naturais, nomeadamente compostos fenólicos, vitamina C, e E e caratenóides, logo estes têm uma ação antioxidante e quimiopreventiva através da atividade inibidora da cicloxigenase-2 (Fortalezas *et al.*, 2010), o fruto possui muitos hidratos de carbono, proteínas, tocoferóis e flavonóides (Barros *et al.*, 2010). Já as folhas, são ricas em compostos fenólicos tais como os taninos, os flavonóides e glicósidos fenólicos (Oliveira *et al.*, 2011), além disso

nas folhas existem também lectinas, composto bioativo raramente descrito (Ribeiro *et al.*, 2012). As folhas são utilizadas como diurético, antisséptico urinário, antidiarreico, depurativo e em terapia de hipertensão, diabetes e como tratamento em algumas doenças inflamatórias (Oliveira *et al.*, 2011).



**Figura 11** - *Arbutus unedo*: folha, flor e fruto.

## 5. Objetivos

Facilmente se compreende a importância das proteínas a nível da maioria dos processos celulares, tornando fulcral a identificação, bem como a caracterização pormenorizada das proteínas, para que seja possível compreender cada vez melhor os processos biológicos em que estas estão envolvidas, ao nível do organismo vivo.

É também fundamental, salientar o fato de as lectinas serem específicas para alguns hidratos de carbono, característica utilizada para o reconhecimento de diferentes células, por descodificação dos seus recetores glicosilados (por exemplo células tumorais). Uma vez que, o processo tumoral implica alteração de expressão e tipologia dos hidratos de carbono na superfície celular, de modo a que possa haver invasão, proliferação e evolução do processo de metastização, as lectinas poderão contrariar este processo, por vias de morte celular programada e necrose, entre outros fatores.

Tendo em conta a prevalência do carcinoma do colón bem como a sua taxa de mortalidade, torna-se cada vez maior a necessidade de procurar novas linhas terapêuticas, exibindo poucos efeitos secundários, sendo as lectinas uma hipótese a considerar devido às suas características de ligação por afinidade a hidratos de carbono, que são biomarcadores do processo tumoral, exibindo discriminação de tecido e patologia, podendo assim revelar propriedades anti-inflamatórias e antitumorais. Como tal, é objetivo principal deste trabalho de

investigação, compreender qual atividade das lectinas do *Arbutus unedo*, *in vivo*, em modelo de colite, tendo em consideração os resultados *in vitro* anteriormente obtidos em células HT29 do cancro do colón.

Sendo assim podemos dividir este trabalho em 2 partes: purificação de proteína (lectina) e produção (*scaling-up*), para avaliar a atividade anti-inflamatória desta lectina; em murganhos, modelo de colite.

## **Capítulo II - Material e Métodos**

## **1. Caraterização polipeptídica de extratos de *Arbutus unedo***

### **1.1 Material**

#### **1.1.1 Material biológico**

##### **Material biológico vegetal**

Na realização dos ensaios foram utilizadas folhas de *Arbutus unedo*. Todas as amostras dos extratos obtidos foram armazenadas em arcas a -80 °C, para conservação das mesmas.

##### **Material biológico animal**

Utilizaram-se eritrócitos de coelho, raça neozelandeza, fornecidos pela empresa Probiológica, na realização dos ensaios de hemaglutinação e, inibição da hemaglutinação pelos hidratos de carbono.

### **1.2 Métodos**

#### **1.2.1 Extração de proteína total de folhas de *Arbutus unedo***

A extração de proteínas total da folha de *A.unedo* foi realizada com base numa versão otimizada do método do glicerol. Nesta extração utiliza-se um tampão de extração (Silva, Regina, & Souza, 2009), com 5%(v/v) de glicerol e 1% (m/v) de Triton X-100. O Triton X-100 apresenta um elevado poder de extração, uma vez que é um excelente detergente não iónico que dissolve as membranas celulares e solubiliza diferentes classes proteicas sem alterar a sua conformação natural (Silva *et al.*, 2009). Laboratorialmente otimizou-se o método modificando a concentração de Triton-X100, de 4% para 1% (m/v), de modo a facilitar os ensaios realizados com eritrócitos, de modo a minimizar a lise celular.

O processo inicia-se com a maceração das folhas com azoto líquido, adicionando-se em seguida, por cada 0,5 g de folha, 0,25 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP), para fazer a retenção dos compostos fenólicos. Adicionou-se ainda um comprimido de inibidor de proteases (Complete mini, EDTA-free), inibidor de proteases serina e cisteína, por cada 10 mL de tampão. Este comprimido não pode conter EDTA uma vez que este é um agente quelante dos iões Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>, iões fundamentais para a atividade das lectinas. Em substituição deste inibidor, podemos também utilizar uma solução de PMSF 250 mM. Neste caso, por cada 5 ml de tampão adicionam-se 20 µL de PMSF (concentração final 1 mM). A extração propriamente dita, realizou-se adicionando mL a mL de tampão de extração (Tris-HCl 50 mM, pH 8, com 5% de glicerol (v/v), 100 mM de KCl e 1% (m/v) de Triton X-100). Está preconizado que para cada 0,5 g de folha se adicionem 1-5 mL de tampão. Após a extração

a amostra é centrifugada a 14.000 g, 30 min a 4°C. Seguidamente o sobrenadante foi filtrado em tela Miracloth (Calbiochem) e dessalinizado em colunas PD-10 (GE Healthcare), já equilibradas em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7.5. Routineiramente, fez-se ainda lavagens, por ultrafiltração, para eliminar restos de Triton X-100.

Os eluidos obtidos foram reunidos, homogeneizados, e armazenados em alíquotas a -80 °C.

### **1.2.2 Determinação da concentração proteica pelo método de Bradford**

A determinação da concentração proteica foi efetuada pelo método de Bradford (1986). Este é um ensaio colorimétrico muito sensível, rápido e muito reprodutível (Bradford, 1976). Baseado no fato do corante Azul Brilhante de Comassie G-250 se apresentar sob duas formas coradas, a azul e a vermelha, sendo que a forma vermelha (forma catiónica do corante) passa a azul (forma aniônica do corante), quando há interação entre o corante e um composto proteico. Este corante, está dissolvido em ácido fosfórico e metanol formando o Reagente de Bradford, quando este reagente interage com uma cadeia lateral básica ou aromática de um aminoácido dá-se a formação de uma coloração azul, devido à estabilização da forma aniônica do corante. Quanto maior a concentração proteica da amostra mais intensa será a coloração apresentada. A formação da coloração azul é medida espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 595 nm (medição da absorvância).

O ensaio é efetuado a partir da análise de uma curva de calibração. Esta é feita em microplaca de 96 poços de fundo em U, utilizando-se como proteína padrão a Albumina de Soro Bovino (BSA), em concentrações entre os 0 µg e os 25 µg. Todos os pontos da curva, bem como as amostras, foram ensaiados em triplicado, garantindo a reprodutibilidade do método. Seguidamente adicionou-se o reagente de Bradford (200 µL) a todos os poços, após 15 min de incubação à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, fez-se a leitura das absorvâncias a um comprimento de onda de 595 nm, (Software KineCalc-KC4).

A determinação do teor proteico das amostras fez-se por interpolação com a curva de calibração.

### **1.2.3 Avaliação do perfil eletroforético de *Arbutus unedo***

Na caracterização de uma amostra proteica é fundamental determinar o perfil eletroforético. Para concretizar este objetivo, realizou-se um gel de poliacrilamida sob condições de desnaturação e redução (SDS-PAGE R), segundo o método descrito por Santos (Santos *et al.*, 1997),

A técnica descrita baseia-se na capacidade de separação das proteínas tendo como base o peso molecular. As proteínas são sujeitas a um campo elétrico, sob o qual vão mover-se do cátodo para o ânodo, dependendo a velocidade do movimento e do tamanho de cada



uma, esta característica implica que as proteínas tenham uma razão densidade de carga/massa constante. Tudo isto é possível devido à adição de agentes desnaturantes à amostra, como é o caso do SDS (detergente aniônico), que confere carga negativa às proteínas presentes na amostra. O SDS tem a capacidade de formar com as proteínas uma ligação muito forte devido ao seu comportamento apolar, expondo a sua zona iônica ao solvente (Robyt & White, 1990). Esta ligação entre o SDS e as proteínas promove a disrupção da estrutura secundária da proteína e a dissociação dos oligómeros proteicos. A saturação proteica em SDS leva também a que surja um efeito de camuflagem da carga de cada proteína, fazendo com que a migração proteica dependa única e exclusivamente do seu peso molecular (*Plummer, 1987*). Além disso, também se adiciona à amostra  $\beta$ -mercaptoetanol para que haja redução de possíveis ligações de persulfureto (Robyt & White, 1990).

Esta técnica iniciou-se pela execução do gel propriamente dito, normalmente um gel de 16 cm x 18 cm x 0,75 cm, formado por um gel de separação e um gel de concentração. O gel de separação é constituído por uma matriz de acrilamida (17,5% (m/v)), bisacrilamida (0,1% (m/v)), tampão Tris-HCl (375 mM) pH 8,8, persulfato de amónio (PSA) (0,03% (m/v)) e Tetrametiletilenodiamina (TEMED) (0,05 (v/v)). Já o gel de concentração, tem como função homogeneizar a frente eletroforética, posicionando-se por cima do gel de separação. O gel de concentração é constituído por: 5% (m/v) de acrilamida, 0,13% (m/v) de bisacrilamida, tampão Tris-HCl 125 mM, pH 6,8, 0,1% (m/v) de persulfato de amónio (PSA) e 0,05% (v/v) de tetrametiletilenodiamina (TEMED). O gel de separação tem maior concentração de acrilamida (17,5%) do que o de concentração (5%), para garantir que a separação é realmente eficiente.

Após se terem feito os géis, montado o sistema vertical e verificado que o mesmo se encontrava bem selado, adicionou-se o gel de separação cuidadosamente, de modo a evitar a inclusão de bolhas de ar. Este gel foi aplicado até cerca de 2 cm do topo do vidro, sendo coberto com butanol (1 mL), para auxiliar a que a polimerização seja uniforme. Após polimerização do primeiro gel, o butanol foi retirado do sistema vertical, e foi aplicado o gel de concentração, tendo sempre em atenção os pontos cruciais da aplicação do gel de separação, já com o pente inserido no molde de modo a formar os poços no gel. Feita a polimerização do gel de concentração, o molde foi colocado na tina de eletroforese (HOEFER SE 600 Ruby da Amersham Biosciences) adicionou-se o tampão de eletroforese (200 mM de glicina, 25 mM de tris-base, 0,2% (m/v) de SDS) cobrindo os elétrodos.

A eletroforese em questão foi executada em condições redutoras, logo o tampão de amostra utilizado era constituído por 100 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol. Em casos de elevado volume de amostra, estas foram precipitadas com acetona (1  $\mu$ L amostra: 4  $\mu$ L acetona), durante 30 min a -20 °C, após precipitação os precipitados resultantes foram resuspensores em tampão de amostra. Todas as amostras foram desnaturadas a 100 °C por 4 min, seguidamente as mesmas foram aplicadas no gel. No gel foram também aplicados 3  $\mu$ L de

marcador de peso molecular (BioRad), entre 10 e 259 kDa. Durante a corrida o gel foi sujeito a uma corrente elétrica de 70 mA, e uma diferença de potencial de 220 V (Pharmacia Gene Power Supply EPS 600) por unidade de gel. A corrida dá-se por terminada quando a linha de frente (azul de bromofenol) atinge o fim do gel.

#### **1.2.4 Coloração do gel pelo nitrato de prata**

A coloração do gel de poli(acrilamida) fez-se pela coloração do nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ), segundo o método de Blum, *et al.*, (1987). Este método de elevada sensibilidade (Creste *et al.*, 2001), é simples e não muito dispendioso (Chevallet *et al.*, 2007). Baseia-se no fato de as proteínas terem a capacidade de se ligarem a íons prata ( $\text{Ag}^+$ ), que em condições apropriadas podem ser reduzidos formando um complexo corado, visível, que permite a detecção das bandas polipeptídicas (Chevallet *et al.*, 2007). A complexação de íons  $\text{Ag}^+$  com grupos amina, ocorre em ambientes alcalinos na presença de enxofre proveniente de resíduos de metionina e cisteína. Sendo assim, a matriz do gel, após a corrida eletroforética, é saturada com íons  $\text{Ag}^+$ , sendo que estes íons se ligam a aminoácidos de proteínas, com características básicas, à superfície do gel. Os íons que não se ligam são removidos, durante as lavagens do processo de coloração.

O procedimento iniciou-se pela imersão do gel na solução de fixação (50% (m/v) metanol, 12% m/v ácido acético e 0,02% v/v formaldeído), num agitador orbital, a baixa agitação, por 20 min, no entanto, caso seja necessário, o gel poderá ficar nesta solução durante a noite. Este passo tem como objetivo prevenir a difusão dos polipéptidos já separados e, a remoção de substâncias interferentes. Seguidamente fizeram-se 3 lavagens de 10 min cada com uma solução de etanol a 50% v/v. Posto isto, removeu-se a solução de lavagem anterior e incubou-se o gel com a solução de pré-tratamento (0,02% m/v hipossulfito de sódio), durante 1 min com agitação. Após este passo lavou-se o gel 3 vezes por 20 seg cada com água destilada. Seguiu-se então a adição da solução corante (11 mM  $\text{AgNO}_3$ , 0,03% v/v formaldeído) durante 10 min, em seguida lavou-se novamente o gel com água destilada, 2 vezes por 20 seg cada. Após as lavagens adicionou-se a solução de desenvolvimento (566 mM  $\text{NaCO}_3$ , 0,02% formaldeído, 16  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ), mantendo-se a solução o tempo necessário, para a revelação das bandas/spots. Quando atingida a revelação pretendida adicionou-se a solução de paragem (50% v/v metanol).

Todas as etapas do procedimento foram efetuadas com baixa agitação em agitador orbital, com a exceção das lavagens com água destilada, que se fez manualmente.

No final desidratou-se o gel, numa solução de metanol 50% (v/v) por um período de aproximadamente 20 min, entre 2 folhas de papel celofane, procedendo à sua secagem, de modo a conservar o gel.

### 1.2.5 Determinação do perfil glicosídico do extrato total

A determinação do perfil glicosídico de um extrato proteico é fundamental para a sua caracterização, uma vez que permite-nos identificar proteínas glicosiladas. Esta técnica é bastante morosa, exigindo que inicialmente seja feito um gel de elevada resolução (SDS-PAGE R), para obter-se o perfil proteico da amostra em estudo. Posteriormente o gel é transferido para uma matriz, que irá servir de suporte à deteção de proteínas imobilizadas.

#### a) Imobilização proteica em membrana de nitrocelulose

A membrana utilizada nesta técnica foi uma membrana de nitrocelulose (Protan BA83, de porosidade 0,2  $\mu\text{m}$ ). Esta membrana tem na sua constituição grupos nitro que se ligam à celulose promovendo um suporte de grande afinidade proteica, facilitando assim a ligação das proteínas à sua superfície. Posto isto inicia-se a transferência, para tal utiliza-se um campo elétrico, tendo como base o mesmo princípio da eletroforese, variando este campo consoante a espessura do gel em estudo.

Neste caso concreto utilizou-se um gel de 0,75 mm de espessura. O gel, membrana, e 8 folhas de papel 3 MM de medida idêntica, foram equilibradas em tampão de transferência (48 mM Tris-Base pH 8,3, 39 mM glicina, 20% (v/v), metanol, 0,04% (m/v) SDS). Após o equilíbrio, fez-se a “sanduiche”, ou seja, colocaram-se 4 folhas de papel 3MM no eletrodo positivo do equipamento de transferência (Transf-Blot, Semi-Dry Transfer Cell – Biorad), retirou-se as bolhas de ar, para não prejudicar a transferência, colocou-se a membrana sobre as folhas e sobrepôs-se o gel, após o que se colocou mais 4 folhas de papel 3MM. Com o equipamento fechado efetuou-se a transferência, aplicando uma diferença de potencial de 15 V, sem limite de amperagem, por 1 h 15 min.

Finda a eletrotransferência a membrana é incubada com agitação baixa, por 5 min, em solução de fixação (ácido acético 10 % (v/v), isopropanol 25% (v/v)). Após incubação a membrana foi lavada durante 1 min com água destilada. Seguidamente a membrana foi corada com solução de Ponceau S (0,1% (m/v) de Ponceau S, ácido acético 25% (v/v)), como descrito por Schleicher e Schuell.

Quanto à glicodeteção das proteínas previamente imobilizadas, foi aplicada a metodologia de Faye e Chrispeels (Faye & Chrispeels, 1985).

Após fixação das proteínas à membrana de nitrocelulose, fez-se uma lavagem por 1 min com TNBS (20 mM Tris pH 7,4, 0.5 mM NaCl). Finda a lavagem, bloqueou-se a membrana, durante 1 h, com TTBS (TBS e Tween-20 0.1% (m/v)). Seguiu-se com a incubação, de 1 h, da membrana com 25  $\mu\text{g/mL}$  de concanavalina A (ConA), em TTBS+Sais (TTBS, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ ), após a incubação a membrana foi lavada 4 vezes com tampão TTBS+Sais, 10 min cada.

Após as 4 lavagens a membrana foi incubada com 50  $\mu\text{g/mL}$  peroxidase em TTBS+Sais, por 1 h. Realizaram-se 4 lavagens de 10 min cada com TTBS+Sais, e uma

lavagem de 5 min com TBSS (5 ml TBS, 5  $\mu$ L  $\text{CaCl}_2$  1 M, e 5  $\mu$ L  $\text{MgCl}_2$  1 M). No final foi adicionada a solução corante (0,05% cloronaftol dissolvido em 16,6% (v/v) metanol, 83,3% (v/v) TBSS e 0,1% (v/v)  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%). Passados alguns minutos visualizaram-se os resultados da glicodeteção.

### **1.2.6 Determinação da atividade hemaglutinante**

Para confirmar a presença de lectinas no extrato proteico, realizaram-se ensaios de hemaglutinação, seguidos de ensaios de inibição da atividade hemaglutinante pelos hidratos de carbono.

Sendo assim, primeiramente, é importante compreender o que é um grupo sanguíneo. Assim, muito grosseiramente, o grupo sanguíneo é definido pelos antígenos presentes na superfície da membrana eritrócitaria. Podem ser proteínas, glicoproteínas ou glicolípidos, e tem que ser detetados por um anticorpo específico. Muitas das vezes, os polimorfismos associados ao grupo sanguíneo podem ser representados pela ausência/presença de uma macromolécula, como é o caso do sistema RhD, de um aminoácido, como nos antígenos  $\text{Fy}^a$  e  $\text{Fy}^b$ , ou pelas diferenças entre monossacáridos, como entre o grupo A e o grupo B. (Daniels & Bromilow, 2007). O grupo sanguíneo é específico da espécie, e varia na sua imunogenicidade.

Hemaglutinação é o nome dado à aglutinação de eritrócitos, visível a olho nu. As lectinas são alguns dos compostos biológicos com a capacidade de provocar aglutinação eritrócitaria, sendo esta a forma de deteção da sua presença (Ribeiro, Catarino, & Ferreira, 2012). Estes ensaios são rápidos e fáceis de aplicar, servem para fazer uma análise prática da presença de lectina nas amostras, permitindo o estudo simultâneo de várias amostras, e não necessitam de purificação prévia do extrato (Ribeiro et al., 2012).

Ao extrato em estudo, foram feitos ensaios de hemaglutinação e de ensaios de inibição da atividade hemaglutinante pelos hidratos de carbono utilizando eritrócitos de coelho a 4% (v/v), em soro fisiológico.

#### **a) Preparação da solução eritrocitária a 4% (v/v)**

Para este ensaio utilizou-se sangue de coelho fresco (preferencialmente sangue colhido no próprio dia), por punção cardíaca, no seio de citrato de sódio. O sangue foi fornecido pela *Probiológica*.

O procedimento iniciou-se com uma primeira centrifugação do sangue total ( $\pm 5$  mL de sangue) a 1.100 g, durante 6 min a 13 °C, para separar o concentrado de eritrócitos do plasma. A partir deste ponto passou-se a trabalhar apenas com concentrado de eritrócitos. Seguiram-se 3 lavagens dos glóbulos com soro fisiológico (40 mL de soro para 5 mL de glóbulos), para tal fizeram-se 3 centrifugações (1.100 g, 6 min, 13 °C), descartando sempre o sobrenadante.

Após as 3 lavagens o sedimento formado, de aproximadamente 4mL, foi ressuspenso em 96 mL de soro fisiológico. À solução anterior foi adicionada tripsina (Sigma), numa concentração de 1% (m/v), e incubou-se por 1 h, a 37 °C, com agitação. Seguidamente fez-se nova centrifugação (1.100 g, 6 min, 13 °C), após a qual se fizeram mais 3 lavagens exatamente iguais às anteriores. No final, o sedimento foi ressuspenso em 96 mL de soro fisiológico, de modo a obter-se a solução a 4% (v/v). A solução foi então dividida e armazenada a 4 °C, para ser utilizada nos testes de hemaglutinação e, inibição da hemaglutinação. A solução considerou-se dentro da validade, enquanto não apresentou hemólise eritrócitaria.

#### **b) Ensaios de hemaglutinação**

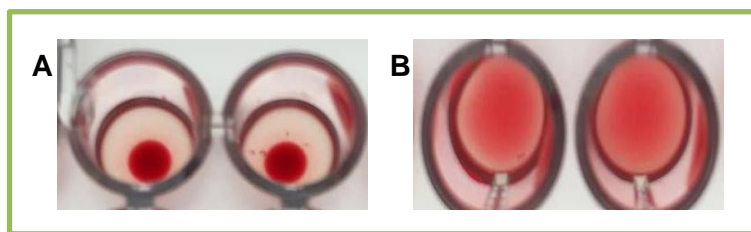
A atividade hemaglutinante foi determinada por microdiluições (diluições seriadas em microplaca) do extrato em estudo em soro fisiológico, numa progressão geométrica de razão 3, frente a uma solução eritrócitaria, de sangue de coelho, a 4% (v/v).

A atividade hemaglutinante expressa-se em unidades hemaglutinantes (U.H.), que corresponde à mínima concentração de proteína que manifesta atividade hemaglutinante. Esta determina-se pela razão entre a concentração total de proteína ensaiada e  $3^{n-1}$ , sendo que n corresponde à última diluição com atividade hemaglutinante (Ribeiro et al., 2012).

$$U.H. = \frac{\text{concentração total de proteína}}{3^{n-1}}$$

A diluição seriada foi feita em placas de 96 poços com fundo em U. Depositaram-se 50-70 µL de soro fisiológico (contendo 2 mM CaCl<sub>2</sub> e 2 mM MgCl<sub>2</sub>) em cada poço. No primeiro poço adicionou-se um volume de extrato entre 50 – 70 µL (50 – 100 µg proteína), realizando-se então uma diluição seriada da amostra, a partir do primeiro poço, numa razão de 1:2. No final adicionou-se 50-70 µL de solução de sangue de coelho 4% (v/v) a todos os poços, passando a amostra a estar diluída numa razão de 1:3. Como em qualquer ensaio fez-se paralelamente um controlo positivo, para isso diluiu-se seriadamente 50 µL de Concanavalina A (Con A) (solução de 500 µg/mL), e um controlo negativo, soro fisiológico. A microplaca foi incubada por 30 min, a 37 °C, sem agitação.

Após a incubação os resultados foram lidos por comparação com o controlo positivo e o negativo, sendo que um resultado negativo corresponde à formação de um núcleo de precipitação de glóbulos num sobrenadante transparente (A), e um resultado positivo à aderência dos eritrócitos ao fundo da microplaca, podendo observar-se fenómenos de retração do coágulo (B) (figura 12 AB).



**Figura 12** - Padrões de aglutinação eritrocitária. (A) controlo negativo, ausência de hemaglutinação (B) Controlo positivo, presença de hemaglutinação.

### c) Inibição da atividade hemaglutinante pelos hidratos de carbono

Após confirmação da presença de lectinas, é importante compreender a especificidade glicosídica das mesmas. Para tal fizeram-se ensaios de inibição da atividade hemaglutinante com diferentes hidratos de carbono (mono, di e trissacáridos).

Seguiu-se a metodologia descrita por *Ribeiro et al, 2012*. Após determinação da atividade hemaglutinante, 4 U.H. do extrato em estudo foram incubadas individualmente, com um conjunto de 16 açúcares: glucose (0,1 M), glucosamina (0,1 M), *N*-acetil-D-glucosamina (0,1 M), galactose (0,1 M), galactosamina (0,1 M), *N*-acetil-D-galactosamina (0,1 M), lactose (0,1 M), manose (0,1 M), rafinose (0,1 M), D (+) fucose (0,3 M), melezitose (0,1 M), metil- $\alpha$ -glucopiranosído (0,1 M), metil- $\alpha$ -manosído (0,1 M), sacarose (0,1 M), ácido *N*-acetil-neuramínico (0,1 M), e L (-) fucose (0,3 M).

Mais uma vez, em microplaca de 96 poços, fundo em U, pipetou-se 50-70  $\mu$ L de soro fisiológico para cada poço, onde posteriormente se fez as diluições seriadas dos 16 açúcares (50-70  $\mu$ L), na razão de 1:2, em soro fisiológico. Posto isto adicionou-se 50-70  $\mu$ L de extrato proteico (4 U.H.) a cada poço e, incubou-se por 1 h, à temperatura ambiente. Após a incubação adicionou-se 50-70  $\mu$ L de solução de eritrócitos 4% (v/v), alterando a diluição dos açúcares para 1:3, voltou-se a incubar a microplaca à temperatura ambiente por mais 1 h.

Para este ensaio utilizaram-se os mesmos controlos positivo e negativo que no ensaio descrito no ponto b).

Um resultado positivo corresponde à formação de um núcleo e precipitação dos glóbulos em sobrenadante límpido (inibição da hemaglutinação). Quando há inibição da hemaglutinação significa que a lectina tem especificidade para o açúcar em questão, ou seja, a lectina ligou-se ao açúcar, sendo impedida de se ligar aos recetores glicosílicos dos eritrócitos. Um resultado negativo significa que a lectina não é específica para o açúcar, tendo ficado livre para se ligar aos recetores do eritrócito, revelando-se pela formação de hemaglutinação.

Neste ensaio determina-se a concentração mínima inibitória (c.m.i), a menor concentração de hidrato de carbono capaz de causar inibição da hemaglutinação.

## **2. Purificação das lectinas de *Arbutus unedo* por cromatografia troca-iônica**

### **2.1 Purificação de lectinas através da coluna Q-Sepharose**

A purificação proteica do extrato total de *A. Unedo*, iniciou-se por cromatografia de troca aniônica, em coluna Q-Sepharose (Pharmacia).

A separação proteica executou-se em AKTA (FPLC – Fast Protein Liquid Chromatography), com equilíbrio prévio da coluna (Q-Sepharose) e bomba A em tampão A (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>) e bomba B, em tampão B (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, 1 M NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>). Após o equilíbrio, nos respectivos tampões, injetou-se 20 mL de extrato, em tampão A. A fração não adsorvida foi então colhida e armazenada a -80 °C para prosseguir o estudo desta. Esta fração foi colhida com base na observação do cromatograma, mais concretamente na observação da subida da condutividade elétrica ( $\geq 80$  mS/cm).

Entre cada 2 corridas (aplicação de 20 mL, cada), a coluna foi lavada em 100% de tampão B, sendo que as frações adsorvidas à coluna, foram também colhidas e armazenadas a a -80 °C para seguimento do estudo da mesma.

O ensaio foi realizado a um fluxo de 1 mL/min, com leitura da absorvância de 280 nm.

Os perfís eletroforéticos, foram posteriormente determinados e analisados, bem como executados ensaios de hemaglutinação (para verificar a presença de lectinas após uma primeira purificação), tanto à fração não-adsorvida, como à fração adsorvida da Q-Sepharose.

### **2.2 Purificação da fração não adsorvida da coluna Q-Sepharose pela coluna Mono-S**

Após verificada a atividade hemaglutinante da fração não-adsorvida da Q-Sepharose, esta foi aplicada numa coluna de troca catiónica, Mono-S (Resource S).

Utilizando novamente o AKTA, lavou-se e equilibrou-se a bombas A e a coluna em tampão A (20 mM ácido fosfórico, pH 2, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>) e, a bomba B em tampão B (20 mM ácido fosfórico, pH 2, 1 M NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>). Após o equilíbrio, injetou-se 8 mL de fração não-adsorvida da Q-Sepharose (resultantes de 8 corridas em coluna Q-Sepharose), em tampão A (a fração foi anteriormente passada para tampão A em colunas PD-10), na coluna Mono-S. A fração não-adsorvida da Mono-S foi imediatamente neutralizada em colunas PD-10, previamente equilibradas em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7.5. As frações, após neutralização, foram armazenadas a -80 °C para

estudos posteriores. Mais uma vez, a fração não adsorvida foi colhida com base na subida da condutividade ( $\geq 80$  mS/cm) observada no cromatograma.

Tal como na purificação anterior, entre cada 2 corridas a coluna foi lavada com tampão B (20 mM ácido fosfórico, NaOH pH 2,0, 1 M NaCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ), sendo que estas também foram colhidas, neutralizadas em colunas PD-10 e armazenadas a  $-80^\circ\text{C}$ , para estudos seguintes.

O ensaio foi também realizado a um fluxo de 1 mL/min, a uma absorvância de 280 nm.

A fração não adsorvida da Mono-S e a fração adsorvida da mesma, foram também submetidas à análise do seu perfil eletroforético, e a ensaios de hemaglutinação, para mais uma vez verificar-se a manutenção da atividade hemaglutinante previamente determinada.

### **3. Ensaio *in vivo* - modelo de colite**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Material Biológico animal**

Foram utilizados murganhos CD-1, do sexo masculino, com uma média de pesos de 31.4 g, com cerca de 6 semanas de idade. Os animais encontravam-se em caixas de polipropileno, com acesso ilimitado tanto a comida como a água, à temperatura de cerca de  $22^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ , expostos a ciclos de 12 h de luz e de escuro.

O ensaio foi realizado no Biotério da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, tendo em conta as normas do Home Office Guidance in the Operation of Animals (Scientific Procedures) Act 1986, publicado por Her Majesty's Stationary Office, London, UK e do Institutional Animal Research Committee Guide for the Care and use of Laboratory Animals, publicado pelas US National Institutes of Health (NIH, Publication nº 85-23, revise 1996). Foram também tidas em conta as guidelines ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. O ensaio teve a aprovação da Comissão de Ética da Faculdade Farmácia da Universidade de Lisboa

#### **3.2 Métodos**

##### **3.2.1 Indução da colite**

A colite foi induzida nos animais utilizando uma dose única de TNBS intracolónico (Direito *et al.*, 2017). Os animais foram submetidos a um jejum de cerca de 24 h antes do processo de indução da colite. No dia da indução todos os animais foram anestesiados com 100 mg/kg de cetamina, e 10 mg/kg de xilazina. Após anestesia, foram administrados 100  $\mu\text{L}$



de uma solução de 2,5% (m/v) de TNBS dissolvido em 50% (v/v) de etanol, por cateter introduzido até cerca de 4,5 cm no colón do animal. Após indução o animal foi colocado em posição de Tredelenburg para evitar possíveis refluxos.

Quatro dias após a indução os animais voltaram a ser anestesiados pelo processo acima descrito, para colheita de amostras de sangue por punção cardíaca. Após colheita das amostras de sangue os murganhos sofreram eutanásia por deslocação cervical. Os animais foram abertos por incisão média do abdómen. Retirou-se o colón livre de aderências, para que este fosse aberto longitudinalmente, com o intuito de observar e classificar a severidade da diarreia. Após abertura do colón, este foi lavado para observação macroscópica, foi medido e fotografado e posteriormente conservado em formaldeído para ser processado futuramente.

### **3.2.2 Grupos em estudo**

Os animais em estudo foram aleatoriamente distribuídos em cinco grupos:

- a) Grupo Sham (n=6): os animais foram submetidos ao processo anteriormente descrito com exceção da indução da colite, uma vez que este grupo de animais corresponde a um controlo negativo, ou seja, grupo sem colite. Durante os 4 dias seguintes foram administrados oralmente com 10 mL/kg de água destilada.
- b) Grupo etanol (n=6): animais cuja indução foi feita com 100 µL de etanol 50% (v/v) em substituição de 100 µL de TNBS. A estes animais durante os 4 dias seguintes foi-lhes também administrado 10mL/kg de água destilada.
- c) Grupo TNBS (n=6): foram induzidos com 100 µL de 2,5% (m/v) de TNBS em 50% (v/v) de etanol. Mais uma vez durante os 4 dias foi-lhes administrado por via oral 10 mL/kg de água destilada.
- d) Grupo Medronho (n=9): animais aos quais foi induzida colite 100 µL de 2.5% (m/v) de TNBS em 50% (v/v) de etanol, mas que durante os 4 dias foi-lhes administrado a amostra em estudo, 6,85 mg/kg de extrato purificado de medronho (*Arbutus unedo*).
- e) Grupo Lectina (n=3): animais aos quais não foi induzida a colite, mas no entanto, durante os 4 dias foram submetidos a administrações orais de 6,85 mg/kg de extrato purificado de medronho (*Arbutus unedo*).

### **3.2.3 Avaliação macroscópica da severidade da colite**

Para observação e classificação da severidade da diarreia, um dos indicadores da severidade da colite, o colón de cada animal foi aberto longitudinalmente, e após lavagem do mesmo procedeu-se à classificação das fezes com base no Score de gravidade de diarreica (tabela 6). Foram medidos os cólons, avaliou-se o tamanho das lesões, em caso da sua presença, bem como qualquer outra alteração considerada relevante na avaliação da colite (como por exemplo existência ou não de zonas úlceradas).

**Tabela 6** - Avaliação da severidade da colite.

Score	Consistência das Fezes
0	Normal ( <i>pellets</i> duros)
1	Ligeiramente mucosa
2	Mole
3	Aquosa

#### **3.2.4 Ensaios histológicos e de imuno histoquímica (em avaliação)**

Após remoção dos cólons, estes foram fixados em 4% (m/v) de formaldeído, no entanto, estes têm que ficar em fixação durante 3 meses, só após este período será possível fazer os cortes histológicos para posterior análise histológica e imuno histoquímica.

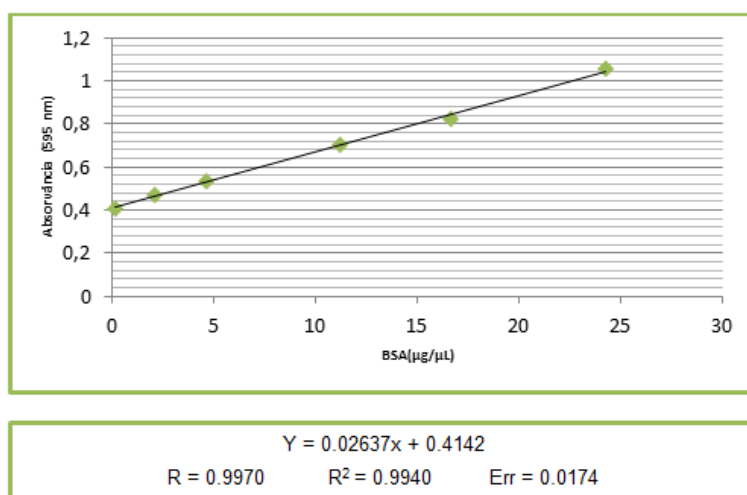
## **Capítulo III – Resultados e Discussão**

## 1. Caraterização polipeptídica de extrato de *Arbutus unedo*

### 1.1 Determinação da concentração proteica pelo método de Bradford

O primeiro passo na caraterização do extrato em estudo, passou pela determinação da respetiva concentração proteica. Nesta determinação, aplicou-se o método de Bradford (1976). Para este método é necessária a execução de uma reta de calibração, para que se estabeleça uma relação entre as diferentes concentrações da proteína padrão utilizada e, os respetivos valores de absorvância (595nm).

Na execução da curva de calibração, utilizou-se a proteína BSA (Sigma) na concentração de 0,5 µg/µL, estabelecendo-se uma reta com concentrações crescentes de BSA: 5, 10, 15, 20 e 25 µg/µL, sendo que todas as concentrações foram ensaiadas em triplicado. A equação da reta representativa da curva de calibração e o respetivo gráfico, cuja equação é:  $Y = 0,02637x + 0,4142$ , encontram-se representados na figura 13.



**Figura 13** - Curva de calibração de BSA (µg/µL), com absorvância a 595 nm (y) e, respetiva equação da reta.

Em paralelo ensaiaram-se as amostras em estudo, em triplicado. Quando necessário, a amostra foi concentrada, ou diluída (fator de diluição introduzido nos cálculos), de modo a que as leituras de absorvância obedecessem à lei de Lambert-Beer. Sendo assim, a leitura espectral permitiu obter um valor de concentração proteica da amostra, tendo como base a média dos triplicados, de várias extrações efetuadas. Para a amostra em estudo, extrato proteico total de *Arbutus unedo*, obteve-se um valor médio de concentração proteica de 0,229 g/100 g de massa fresca (tabela 7).

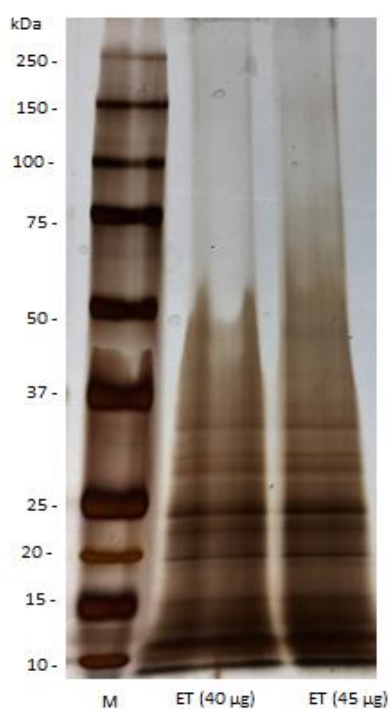
**Tabela 7-**Teor proteico do extrato total de *Arbutus unedo*.

<i>Arbutus unedo</i>	massa (g)	Vol extrato (mL)	Conc. $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Conc. g/100g (massa fresca)
Extrato total folha	15	49	0,6535	0,229
	18	52	0,7682	
	23	63	0,922	

## 1.2 Avaliação do perfil eletroforético de *Arbutus unedo*

Para a avaliação do perfil polipeptídico do extrato em estudo, *Arbutus unedo*, realizou-se uma corrida eletroforética, com aplicação de 40 e 45  $\mu\text{g}$  de proteína. Fez-se, tal como descrito anteriormente, uma separação eletroforética (17,5 % m/v de acrilamida), na presença de SDS (agente desnaturante) e de  $\beta$ -mercaptoetanol (agente redutor) (SDS-PAGE-R).

A análise do perfil eletroforético, após coloração pelo nitrato de prata (figura 14), revela um perfil bastante simples, pouco abrangente e com poucas bandas (10-60 kDa), sendo que a grande maioria destas é de baixo peso molecular, entre os 10-25 kDa. Existem algumas bandas mais representativas de cerca de: 8, 12, 15, 20, 24-25, 28 e 32 kDa.



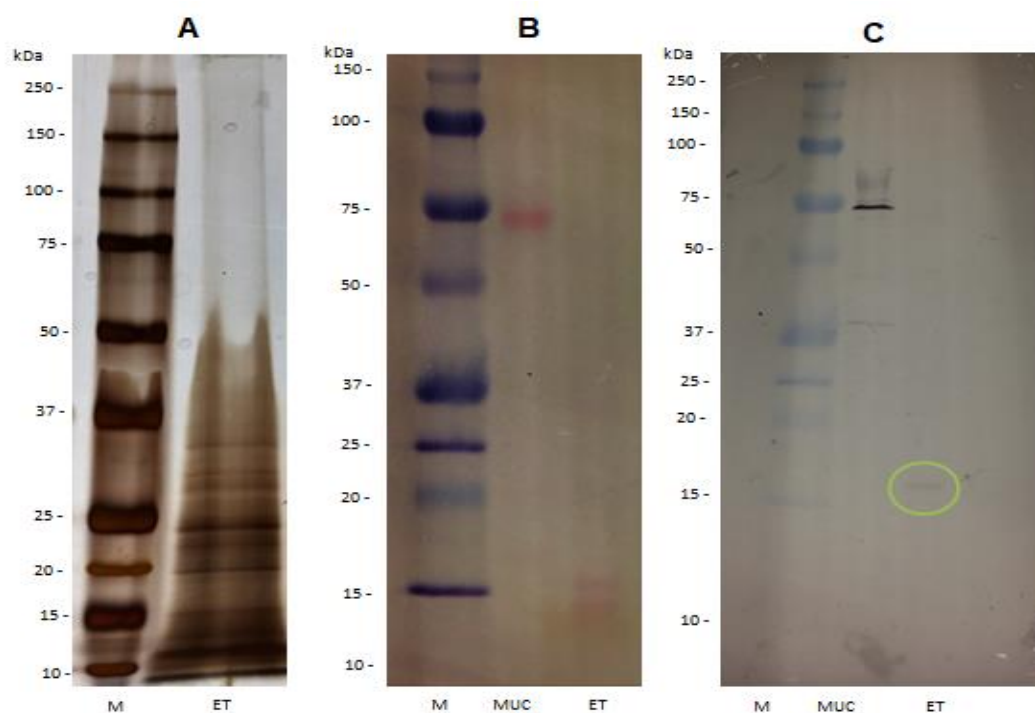
**Figura 14** - SDS-PAGE R a 17,5% (m/v) em acrilamida, do extrato total de *A.unedo*, com revelação pela  $\text{AgNO}_3$ . Aplicaram-se 40 e 45  $\mu\text{g}$  de extracto proteico da folha de *A.unedo* (ET), e aplicaram-se 3  $\mu\text{L}$  de marcador de massa molecular (M).

### 1.3 Determinação do perfil glicosídico do extrato total

Na continuação da caracterização do perfil polipéptico, fez-se a detecção das proteínas glicosiladas. Após a eletroforese (SDS-PAGE-R) do extrato total de *A.unedo* em estudo fez-se uma transferência proteica, com imobilização em membrana de nitrocelulose, seguindo-se uma glicodeteção.

O método aplicado, método da concanavalina A - Peroxidase, descrito por Faye & Chrispeels, (1985), apenas reconhece glicoproteínas do tipo manose e glucose, uma vez que a Con A liga-se especificamente a resíduos do tipo  $\alpha$ -D-manopiranosido e  $\alpha$ -D-glucopiranosido, ou seja, por este método existe a possibilidade de algumas glicoproteínas não serem detetadas. No entanto, sabe-se que a Con A tem uma larga aplicação na detecção da maioria das glicoproteínas (Ribeiro *et al.*, 2012). Sendo assim, por este método, são evidenciadas as bandas glicosiladas com especificidade glucose e manose.

Na figura 15C é perceptível uma banda glicosilada de aproximadamente 15-17 kDa, coincidente com uma banda polipeptídica, do extrato total de *A.unedo* (A).



**Figura 15** - Perfil eletroforético, transferência e glicodeteção do extrato total de *A.unedo*. M – Marcador de massa molecular; ET – Extrato total de *A.unedo*; MUC – mucina. **(A)** SDS-PAGE-R a 17,5% (m/v) de acrilamida corado pelo AgNO<sub>3</sub>, aplicaram-se 45 µg de extracto proteico da folha de *A.unedo*, e 3 µL de marcador de peso molecular. **(B)** Transferência para membrana de nitrocelulose, corada com Ponceau-S, aplicaram-se 10 µL de marcador de massa molecular, 50 µg de controlo positivo, mucina, e 350 µg de extrato total de *A.unedo*. **(C)** Deteção de bandas glicosiladas ao nível dos extractos proteicos das espécies em estudo.

Esta banda, de 15-17 kDa, está presente tanto na membrana revelada pelo Ponceau S (figura 15B), como no gel de SDS-PAGE-R (figura 15A), ou seja, é uma banda polipeptídica, que exibe uma componente glicosilada. Além desta banda é possível também visualizar uma banda, muito tênue, entre aproximadamente os 50-55 kDa, que não está representada na membrana (figura 15B), nem no gel de SDS-PAGE-R (figura 15A), podendo ter sido detetada, devido à sensibilidade do método, sendo de natureza glicoproteica.

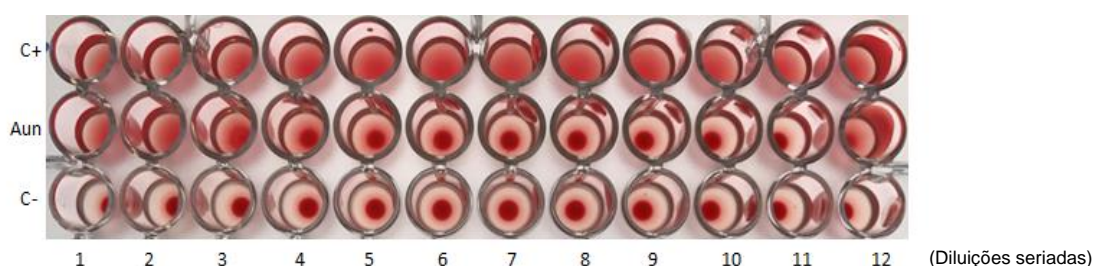
A avaliação do perfil de glicoproteínas, ao nível do extrato proteico, ou fração, no contexto de lectinas, torna-se importante porque, tal com descrito na sua definição, estas podem, ou não, ser glicoproteínas, contribuindo assim esta deteção para a sua caracterização.

## 1.4 Determinação da atividade hemaglutinante de extrato proteico de *A.unedo*

### a) Ensaio de hemaglutinação

Para a caracterização correta deste extrato proteico, foi mandatória a avaliação do carácter de lectina da amostra. Para tal, executaram-se ensaios de determinação da atividade hemaglutinante (figura 16), ou seja, determinou-se a capacidade da amostra, mais concretamente de algumas proteínas do extrato, aglutinarem eritrócitos de coelho. O ensaio foi realizado como descrito no ponto 1.2.6 do capítulo II.

A atividade hemaglutinante é representada sob a forma de unidade hemaglutinante (U.H.), correspondendo à menor concentração proteica capaz de provocar aglutinação numa solução de eritrócitos de coelho a 4% (v/v).



**Figura 16** - Atividade hemaglutinante de extrato total de *A.unedo*: diluições seriadas (1:3) de extrato de *A.unedo* (Aun) aplicaram-se 150 µg de extrato total de *A.unedo*; Controlo negativo (C-, soro fisiológico); Controlo positivo (C+, concanavalina A).

Neste tipo de ensaio, é fundamental, ter-se em conta a importância da estequiometria das reações, uma vez que concretamente, existe uma relação ideal entre a concentração de proteína e os recetores glicosilados, presentes na membrana eritrocitária.

O cálculo da atividade hemaglutinante do extrato total de *A. Unedo* está abaixo representado.

$$U.H. = \frac{\text{concentração total de proteína}}{3^{n-1}} \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow U.H. = \frac{150 \mu g}{3^{3-1}} \Leftrightarrow U.H. = 16,67 \mu g$$

A partir da análise da figura 16, conclui-se que a atividade hemaglutinante do extrato total está presente até à 3ª diluição, tendo em conta que a diluição seriada aplicada foi de 1:3, temos então uma diluição de 1:9. O calculo da unidade hemaglutinante do extrato total de *Arbutus unedo* é de U.H.=16,67 µg. Este resultado significa que a amostra em estudo tem caráter de lectina, ou seja, tem poder de aglutinar eritrócitos de coelho numa solução a 4% (v/v), tendo o extrato de *Arbutus unedo* a capacidade de se ligar aos recetores glicosilados dos glóbulos vermelhos, exibindo a sua atividade de lectina.

A atividade de lectina de *A.unedo* está pouco explorada na literatura. Numa revisão feita por Miguel *et al.* (2014), não é explorada a presença de lectinas, frisando maioritariamente a relevância do fruto de *A.unedo*, descrevendo a sua composição ao nível de compostos fenólicos, voláteis, de açúcares presentes, vitaminas, minerais entre outros. Quanto à folha de *A.unedo* refere muito superficialmente a sua composição relativa aos compostos acima descritos, nunca frisando a presença de lectinas. Ribeiro *et al.* (2012), faz referência à presença de lectinas e à ligação de polipéptidos de folha de *A.unedo*, aos recetores glicosilados eritrocitários, citando até mesmo a especificidade aos hidratos de carbono pelas lectinas da folha de *A.unedo*.

A determinação da atividade hemaglutinante é fundamental para que se possa caracterizar a afinidade de ligação da lectina aos hidratos de carbono. O ensaio de inibição da atividade hemaglutinante pelos hidratos de carbono, está intimamente ligado ao ensaio de hemaglutinação, pela necessidade de determinar a U.H., para o concretizar.

A determinação da inibição da atividade hemaglutinante pelos hidratos de carbono, é complementar à determinação da atividade hemaglutinante na caracterização de uma amostra proteica do tipo lectina, permitindo, com base na especificidade de ligação aos hidratos de carbono, classificar as lectinas, em classes distintas de especificidade ao hidrato de carbono, fazendo com que estas exibam papéis fisiológicos distintos, como por exemplo, atividade antifúngica (lectinas com especificidade à quitina, polímero de *N*-acetil-glucosamina) e, reconhecimento de glicanos aberrantes, no processo tumoral (fucoses e ácido siálico).

Resultados de ensaios anteriores (Ribeiro *et al.*, 2012; Oliveira, 2017), mostram que as lectinas da folha de *A.unedo* têm especificidade para determinados hidratos de carbono, ou seja, há inibição da hemaglutinação quando em contato com determinado açúcar. Ribeiro *et al* (2012), demonstrou que as lectinas em extrato total de *A.unedo* seriam específicas para melezitose, metil-α-manósido, *N*-acetil-D-glucosamina e metil-α-glucopiranosido, sendo que,

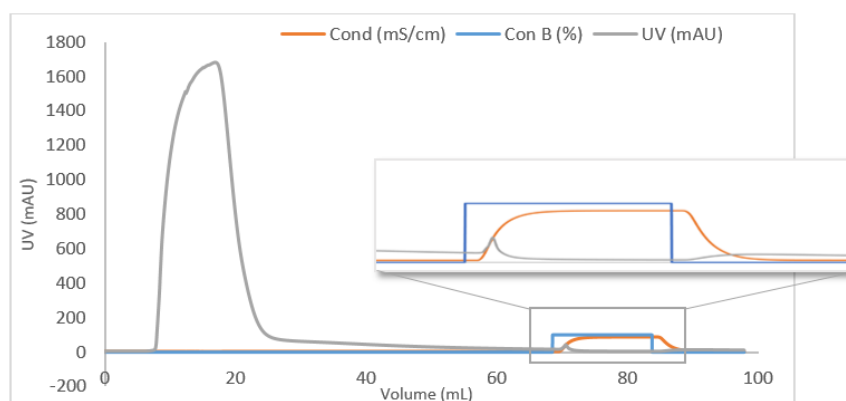


Oliveira (2017), acrescenta ainda que as lectinas, para o mesmo extrato, também são específicas para o açúcar D-galactosamina, sacarose e L- fucose.

## 2. Purificação das lectinas de *Arbutus unedo*

O objetivo deste trabalho foi dar continuidade ao trabalho anteriormente realizado por Nunes (2014) e Oliveira (2017), no sentido de produzir a proteína (lectina) purificada, necessária para averiguar a atividade anti-inflamatória, desta lectina, em modelo *in vivo* (modelo de colite em murganho).

O extrato total proteico de *Arbutus unedo* sofreu dois processos de purificação anteriormente otimizados, baseados em cromatografia de troca-iônica. Iniciou-se a separação proteica, com uma prévia purificação por cromatografia de troca aniônica, em coluna Q-Sepharose (pH 7,5), com aplicação da fração não adsorvida obtida, a uma coluna Mono-S (cromatografia de troca catiónica), com recolha da fração não adsorvida e, adsorvida (pH 2,0). Na figura 17 é apresentado o cromatograma representativo da ultima fase de purificação.



**Figura 17** - Representação gráfica final (cromatograma) da purificação proteica pela coluna Mono-S. Coluna equilibrada em tampão A (20 mM ácido fosfórico e NaOH, pH 2,0, 2 mM  $\text{CaCl}_2$  e 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ); e tampão de eluição B (20 mM ácido fosfórico pH 2,0 + 1 M NaCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$  e 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ). O fluxo utilizado nestes ensaios foi de 1 mL/min.

Era esperado que a fração adsorvida à coluna Q-Sepharose não exibisse atividade hemaglutinante (Oliveira, 2017), uma vez que, em ensaios anteriores foi feito o fracionamento das proteínas adsorvidas à Q-Sepharose, foram testados todos os eluídos no que respeita à atividade hemaglutinante, e nenhum dos eluídos revelou atividade hemaglutinante. Assim, deu-se continuidade com a fração não adsorvida à Q-Sepharose, fração que exibia atividade hemaglutinante.

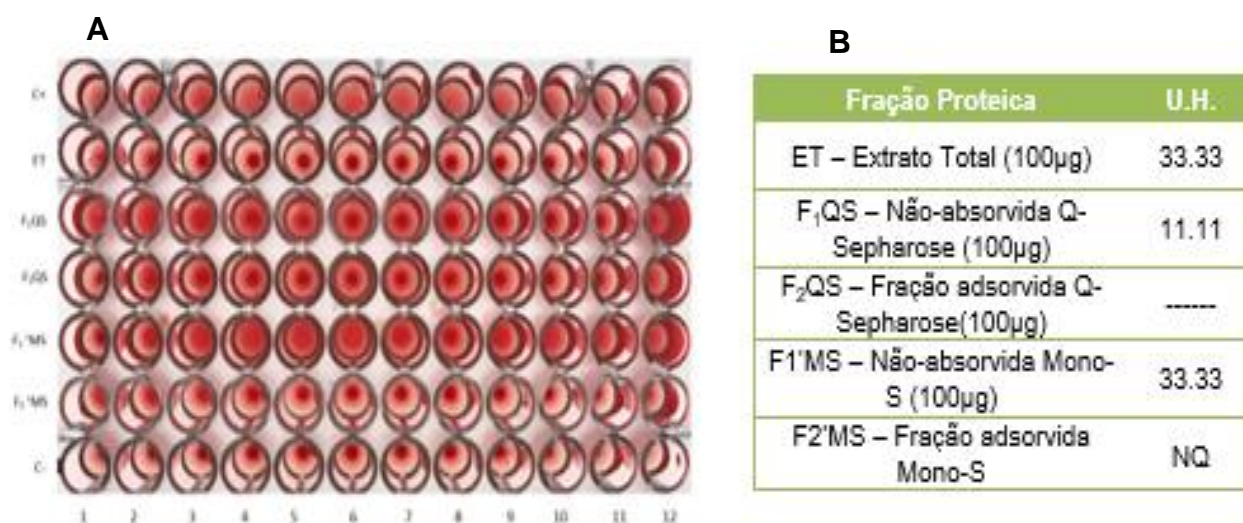
Durante o processo de purificação, o teor proteico das diferentes frações obtidas (extrato total, fração não adsorvida da Q-Sepharose, fração adsorvida da Q-Sepharose, fração não

adsorvida da Mono-S e fração adsorvida da Mono-S), diminuiu drasticamente, sendo que, para a fração adsorvida à coluna Mono-S, não foi exequível a sua quantificação, pelo fato de a proteína ser escassa. Esta diminuição do teor proteico poderá ser justificada pelo fato da amostra já ter passado por 2 processos bastante complexos de purificação, havendo sempre o problema de perda de proteína associado. Quanto às frações adsorvidas nas duas colunas observa-se uma diminuição acentuada entre a fração não-adsorvida e a adsorvida da mesma, sendo de notar que a concentração proteica da amostra da fração adsorvida da coluna Mono-S não foi quantificável ( $\pm 0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Esta quebra abrupta pode dever-se ao fato de a purificação em coluna Mono-S ser feita a pH 2,0, pH a que muito poucas proteínas/polipéptidos resistem, sofrendo desnaturação e degradação proteica, tornando-a quase inexistente, necessitando de uma concentração prévia.

Fez-se a monitorização da atividade de lectina, nas diferentes fases da purificação (extrato total, fração não adsorvida da Q-Sepharose, fração adsorvida da coluna Q-Sepharose, fração não adsorvida da Mono-S e fração adsorvida da coluna Mono-S), assim como da concentração proteica, e também quanto à avaliação do perfil eletroforético das diferentes fases de purificação.

## **2.1 Avaliação da atividade hemaglutinante ao longo da purificação**

Fazendo a avaliação e comparação da atividade hemaglutinante de cada fração obtida, facilmente nos apercebemos de que em praticamente todas as fases, extrato total, fração não adsorvida da Q-Sepharose, fração não adsorvida da Mono-S e fração adsorvida da coluna Mono-S existe atividade hemaglutinante (figura 18A), exibindo U.H. diferentes, mantendo a amostra a atividade esperada. A única fração em que não foi observada atividade hemaglutinante foi na fração adsorvida da coluna Q-Sepharose, como referido anteriormente. Este resultado faz-nos pressupor que todas as proteínas com atividade hemaglutinante foram recolhidas na fração não-adsorvida da coluna Q-Sepharose, ficando adsorvida apenas a fração proteica sem atividade, a mais representativa. Quanto à coluna Mono-S verificámos que tanto a fração não-adsorvida como a fração adsorvida exibem presença de lectinas. Os resultados referentes ao cálculo da unidade hemaglutinante (U.H.) está sintetizado na Figura 18B.

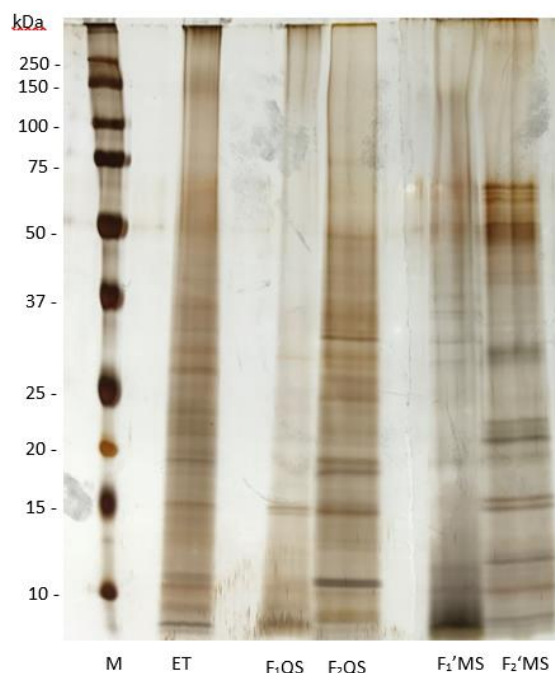


**Figura 18 - (A)** Atividade hemaglutinante: efetuaram-se 12 diluições seriadas (1:3) de extrato de *A.unedo* (ET); fração não adsorvida da Q-Sepharose (F<sub>1</sub>QS); fração adsorvida da Q-Sepharose (F<sub>2</sub>-QS); fração não-adsorvida da Mono-S (F<sub>1</sub>'MS); fração adsorvida da Mono-S (F<sub>2</sub>'MS); controlo negativo (C-, soro fisiológico); controlo positivo (C+ concanavalina A). **(B)** Atividade hemaglutinante e unidades hemaglutinantes (U.H) em µg, associadas nas diversas fases da purificação. NQ – não quantificável.

Estes resultados permitem concluir que, após fracionamento pela coluna Mono-S, ainda existem polipéptidos com atividade, mesmo após serem sujeitos a pH tão ácido, como o pH 2,0. Este resultado é bastante interessante, pois permite-nos especular no sentido de estes polipéptidos resistirem ao pH gástrico (1,5 – 3,5), podendo, provavelmente serem administrados oralmente, não exigindo grande proteção gástrica.

## 2.2 Caracterização polipeptídica das frações proteicas obtidas por cromatografia de troca-iónica

A caraterização polipéptidica das diversas fases da purificação, a partir do extrato total de *A.unedo*, pode ser visualizada na figura 19. Verifica-se que existem semelhanças entre os perfis das frações não-adsorvidas da Q-Sepharose e da Mono-S, em comparação com o perfil do extrato total. Existem algumas bandas em comum nos 3 perfís, nomeadamente a de peso molecular  $\pm 8$  kDa, de peso molecular de  $\pm 12$  kDa e, uma outra banda, pouco nítida de  $\pm 32$  kDa. Quando analisados o perfil, da fração adsorvidas à coluna Mono-S, revelam-se alguns polipéptidos na zona de peso molecular, 8-15 kDa, 19-22,5 kDa, 32 kDa, 40 e 50-68 kDa. A banda de 15 kDa, revela-se de particular interesse pelo facto de que, em ensaios anteriores (Nunes, 2014), exibir ligação aos recetores glicosilados das membranas das células HT29, do cancro do cólon. Alguns destes polipéptidos, pertencentes à fração adsorvida da Mono-S, serão os responsáveis pela atividade hemaglutinante encontrada nesta fração.



**Figura 19** - SDS-PAGE R a 17,5% (m/v) de acrilamida do extrato total de *A.unedo*, (ET), fração não adsorvida da Q-Sepharose (F<sub>1</sub>QS), fração adsorvida da Q-Sepharose (F<sub>2</sub>QS), fração não adsorvida da Mono-S (F<sub>1</sub>'MS), fração adsorvida da Mono-S (F<sub>2</sub>'MS), com revelação pela AgNO<sub>3</sub>. M-Marcador de massa molecular. Aplicaram-se 45 µg de cada amostra de *A.unedo*. Aplicaram-se 3 µL de marcador de massa molecular (M).

Estes resultados, permitem relacionar as diferentes fases do processo de purificação, a que a amostra de extrato total foi submetida, concluindo que apesar das alterações a que esta foi exposta, se mantém sempre um padrão polipeptídico que nos permitem caraterizar a amostra. O fundamental na última fase, fração não adsorvida da coluna de Mono-S, foi garantir que esta, após purificação, ou seja após ser exposta a um pH 2,0, mantinha a sua atividade hemaglutinante, para ser utilizada nos ensaios *in vivo*, na exploração da sua atividade anti-inflamatória, em murgancho com modelo de colite. É também importante salientar que a fração não adsorvida da Mono-S foi anteriormente, testada *in vitro*, em ensaios de avaliação da citotoxicidade e de exploração do seu mecanismo de ação (Oliveira, 2017), tendo sido evidenciado um mecanismo de morte celular, para as células do cancro do cólon, HT29.

### 3. Avaliação *in vivo* (modelo de colite), da atividade da fração purificada de lectinas do *A. unedo*

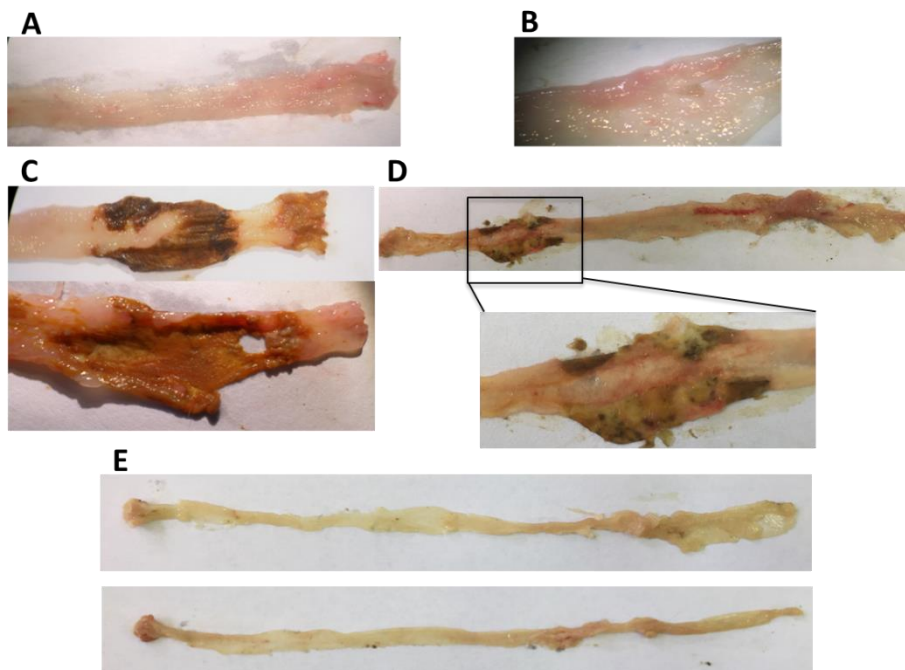
A avaliação da atividade da lectina purificada, a partir de extratos proteicos de *Arbutus unedo*, fez-se em murganhos, com indução prévia de colite e respetiva comparação com grupos controlo (Grupo sham, Grupo etanol e Grupo lectina). Após indução da colite com

TNBS (Mat. Métodos 3.2.1), nos quatro dias seguintes, os animais foram diariamente expostos, por administração oral, a uma dose de 6,85 mg/kg, de lectina purificada. Ao 5º dia, os animais em ensaio, após se ter feito a colheita de sangue (para posterior avaliação dos marcadores de inflamação), foram eutanasiados, os cólons retirados e, o conteúdo em fezes analisados, para clarificação da severidade da diarreia. Os cólons foram posteriormente observados e, realizado o seu registo fotográfico.

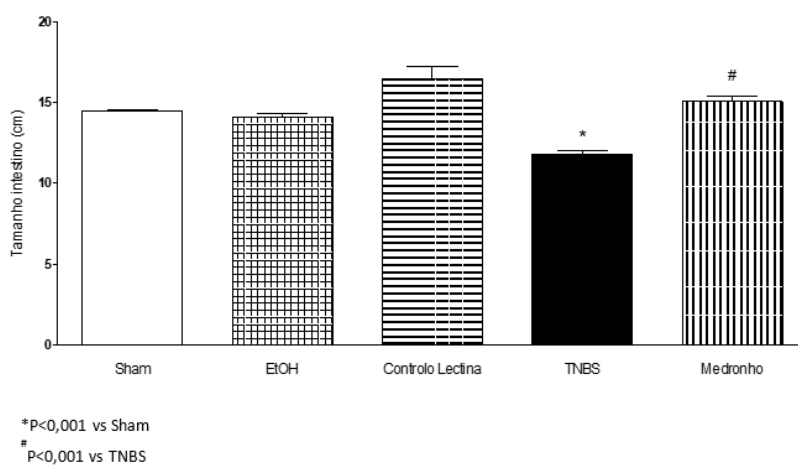
Da análise da figura 20 e figura 22, apercebemo-nos que os cólons do grupo sham (figura 20A), quer do grupo etanol (figura 20B), ao qual foi administrado etanol, não revelam sinais de lesão colónicas, significando que o etanol, na concentração aplicada, não tem efeito lesivo no tecido do cólon. Também o comprimento dos cólons exibiu normalidade (figura 21). Quanto à consistência das fezes, obteve-se um score 0, ou seja consistência normal (pellets duros) (figura 23). Todos os elementos destes dois grupos sobreviveram aos 5 dias de ensaio, preconizados no modelo.

No grupo TNBS (figura 20C), são observadas diferenças significativas quando comparados com os dois grupos anteriores (figura 20A e figura 20B, figura 22), observando-se uma, diminuição significativa do comprimento dos cólons (figura 21). Observam-se lesões muito grandes, com formação de zonas úlceradas (figura 20C). Quanto à severidade da diarreia (figura 23), esta revelou ser maioritariamente aquosa (score 3), mais um sinal do mau prognóstico. Este grupo exibiu uma taxa de mortalidade de cerca de 30%.

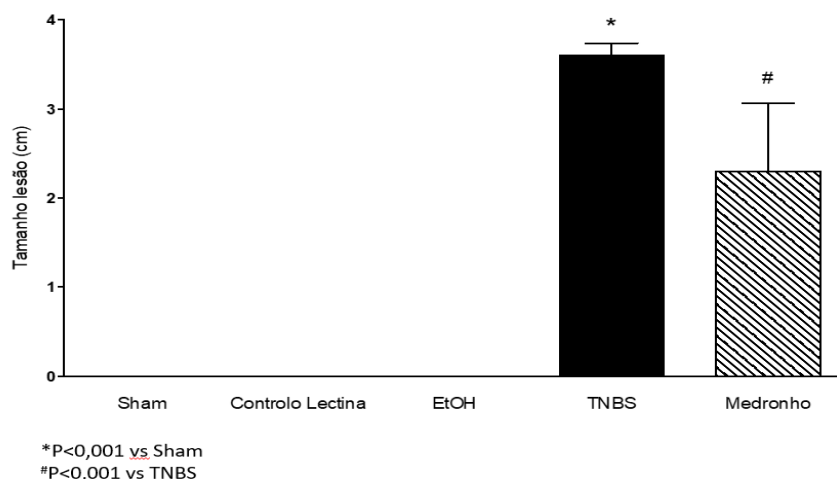
O grupo lectina purificada (Medronho), grupo ao qual foi induzida colite e ao qual foi administrado extrato de *A.unedo* purificado, revelou macroscopicamente, uma atenuação dos sinais de lesão do cólon quando comparados com o grupo TNBS (figura 20D). Quanto aos comprimentos dos cólons estes mantêm-se semelhantes aos comprimentos dos grupos Sham e Etanol, ao contrário do que se passou com o grupo TNBS, não havendo diminuição significativa do comprimento (figura 21). Em relação às lesões colónicas, também se verifica uma diminuição significativa do seu tamanho, e ausência de zonas úlceradas neste grupo (figura 20D), quando comparadas com o grupo TNBS. Analisando a consistência das fezes deste grupo são maioritariamente, ligeiramente mucosas (score  $\pm 1,5$ ) (figura 23), o que também constitui um sinal de remissão da colite (figura 23). Estas diferenças são facilmente observadas macroscopicamente imediatamente após a remoção dos cólons, levando a que se conclua que a lectina purificada de *Arbutus unedo*, contribui para a diminuição dos sinais de lesão do cólon, diminuindo a reação inflamatória, logo os sinais de colite, quando comparados com os resultados do grupo TNBS.



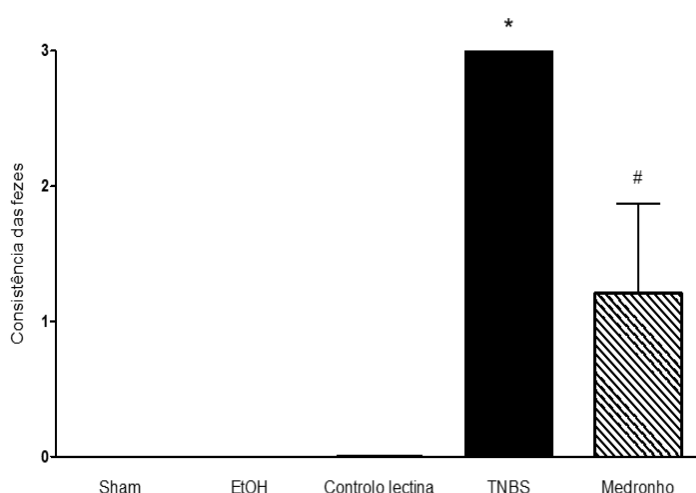
**Figura 20** - Observações a microscópio cirúrgico do cólon aberto transversalmente. (A) Grupo Sham; (B) Grupo Etanol; (C) Grupo TNBS; (D) Grupo Lectina (Medronho); (E) Grupo controlo Lectina



**Figura 21** -Efeito do extrato purificado de *A.unedo* no comprimento do cólon (cm). Grupo Sham (n=6), Grupo EtOH (n=6), Grupo TNBS (n=10), Grupo Lectina (Medronho) (n=9), Grupo Lectina controlo(n=3).



**Figura 22** - Efeito do extrato purificado de *A.unedo* no comprimento da lesão (cm). Grupo Sham (n=6), Grupo EtOH (n=6), Grupo TNBS (n=10), Grupo Lectina (Medronho) (n=9), Grupo Lectina Controlo (n=3).



**Classificação da gravidade da diarreia**

\*P<0,001 vs Sham  
#P<0,001 vs TNBS

Score	Consistência das fezes
0	Normal ( <i>pellets</i> duros)
1	Ligeiramente mucosa
2	Mole
3	Aquosa

**Figura 23** - Efeito do extrato purificado de *A.unedo* na avaliação da severidade da diarreia. Grupo Sham (n=6), Grupo EtOH group (n=6), TNBS group (n=10), Grupo Lectina (Medronho) (n=9), Grupo Lectina (n=3).

Fez-se também, a análise do grupo Lectina controlo, grupo ao qual não foi induzida colite, em que se a administrou oralmente, a mesma concentração de lectina purificada, com o intuito de compreender se a lectina em estudo exibe especificidade para os recetores glicosilados da célula do cólon normal. Os resultados deste grupo, são idênticos aos obtidos

para o grupo Sham, demonstrando que a lectina não exibiu nenhum efeito adverso sobre o tecido normal do cólon, o que é justificado pela ausência de lesões (figura 20E e figura 23), comprimento normal do cólon (figura 21) e, consistência normal das fezes (score zero – fezes normais – pellets duros) (figura 23).

A administração da fração de lectina purificada, a partir do extrato de *A.unedo*, em murganhos com colite induzida mostra-nos que há uma diminuição nos vários sinais macroscópicos de inflamação, atenuação da diminuição do comprimento do cólon, redução da extensão da lesão, sem ocorrência de zonas úlceradas, e diminuição da severidade da diarreia. Quanto aos estudos histológicos, aguardam-se resultados.

Estudos anteriores, com a mesma fração de lectina purificada, dirigidos ao mecanismo molecular de ligação ao hidrato de carbono e, de mecanismo de ação, revelaram que a incubação desta fração de lectina, com as células HT29, do cancro do cólon, induziam a morte celular, com diminuição do metabolismo do MTS e, aumento das LDH, numa relação dose dependente mas, que não havia aumento da concentração de caspases nem de núcleos apoptóticos (Oliveira, 2017).

O facto de, no ensaio *in vivo*, haver diminuição acentuada das lesões do cólon, por exposição a lectinas purificadas, e com base no seu mecanismo molecular de ligação ao hidrato de carbono, leva-nos a concluir que possivelmente esta fração liga-se aos recetores glicosilados aberrantes das células do cólon, expressos durante o processo inflamatório, que apresentam recetores diferentes dos da célula normal, de modo a que a lectina exerça a sua atividade biológica, conduzindo à regressão da lesão, por um mecanismo de libertação de mediadores que poderão exercer citotóxicidade e levar à necrose ou apoptose das células alteradas, que exibem aberração glicómica. O tecido normal do cólon, por não exhibir estes recetores diferenciados, não provocaram ligação específica da lectina às suas membranas celulares, não exibindo, por isso citotoxicidade (Oliveira, 2017). Ainda, tendo como sustentação, resultados anteriores (Ribeiro *et al.*, 2012; Oliveira, 2017), poder-se-á especular que as células alteradas do cólon, poderão expressar recetores do tipo glucosamina, galactosamina, manose e, L-fucose, sendo que estes hidratos de carbono, são característicos da aberração glicómica característica do processo tumoral.



## **Capítulo IV – Conclusões Finais**

O grande objetivo deste projeto foi purificar e rentabilizar, a fração de lectina de extrato proteico de *Arbutus unedo*, processo anteriormente otimizado, para verificar a sua atividade anti-inflamatória, em modelo *in vivo* (modelo de colite em murganho), fração esta que tinha já revelado, *in vitro*, atividade antitumoral para as células HT29, do cancro do cólon.

Tendo em conta os resultados obtidos nos ensaios *in vivo*, facilmente se conclui que a lectina de *Arbutus unedo* tem de facto efeito anti-inflamatório no modelo de colite em murganhos, verificando-se diferenças significativas entre o controlo positivo utilizado (Grupo TNBS – murganhos ao qual apenas se induziu colite com TNBS) e, o nosso grupo de estudo (Grupo Medronho), revelando remissão acentuada, das lesões ulcerosas do cólon. Verifica-se também que esta lectina, muito provavelmente é específica para a aberração glicómica, ou seja, liga-se aos recetores glicosilados aberrantes das células do colón inflamado, uma vez que o estudo simultâneo do efeito da lectina de *A.unedo* em murganhos saudáveis, não revelou diferenças, entre o padrão de controlo negativo (Grupo Sham e Grupo EtOH) e o grupo controlo da lectina. Sendo assim muito provavelmente a lectina em estudo não afeta células do colón sem alterações glicómicas, não exibindo especificidade para os recetores glicosilados das células normais do cólon.

Este resultado permite-nos, com mais segurança, afirmar que esta lectina possivelmente não provocará efeitos secundários ao nível do cólon, podendo talvez ser aplicada na produção de fármacos associados a processos de inflamação do colón, ou até mesmo em fármacos associados a processos tumorais.

Além disso, os ensaios *in vivo* permitiram também concluir que, quanto à aplicação farmacológica, esta lectina poderia ser aplicada oralmente, tendo em conta a sua resistência a pH muito baixo (pH 2,0) na fase de purificação (exibe atividade hemaglutinante mesmo após passar por um processo de purificação a pH 2), sabendo que no homem o pH estomacal pode ser de 1,5 – 3,5.

Neste momento seria pertinente dar continuidade ao estudo em questão, uma vez que, apesar de toda a inovação e tecnologia já desenvolvida, a maioria dos casos de colite ulcerosa ainda continua a resultar em carcinoma colorretal, cuja taxa de mortalidade é relativamente alta. Sendo assim, é necessário o desenvolvimento de novas terapêuticas, principalmente terapêuticas com menos efeitos secundários, como acontece na quimioterapia. As lectinas por todas as suas características bioquímicas, e pelo seu perfil anti-inflamatório (*in vitro* e *in vivo*) e antitumoral, são excelentes candidatas.

O próximo passo será sequenciar a lectina em estudo e compreender qual o perfil de especificidade aos hidratos de carbono exibido pela fração purificada (uma vez que até hoje não foi possível determiná-lo), para que, além da terapêutica, seja possível talvez aplicar esta lectina no diagnóstico precoce do carcinoma colorretal.

Em suma, a lectina em estudo tem uma excelente capacidade anti-inflamatória e, provavelmente, antitumoral sendo o seu estudo bastante pertinente devido à sua aplicação direta no diagnóstico e terapêutica de patologias associadas a mecanismos inflamatórios, como é o caso da colite ulcerosa, e a mecanismos tumorais, como é o caso do carcinoma colorretal.

## Referências Bibliográficas

- Abbott, K. L., Lim, J. M., Wells, L., Benigno, B. B., McDonald, J. F., & Pierce, M. (2010). Identification of candidate biomarkers with cancerspecific glycosylation in the tissue and serum of endometrioid ovarian cancer patients by glycoproteomic analysis. *Proteomics*, 10(3), 470–481. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900537>.
- Aghagolzadeh, P., Radpour, R. New trends in molecular and cellular biomarker discovery for colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, v. 22, n. 25, p. 5678-93, Jul 07 2016. ISSN 1007-9327.
- Alencar, N. M. N., Teixeira, E. H., Assreuy, A. M. S., Cavada, B. S., Flores, C. A., & Ribeiro, R. A. (1999). Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. *Mediators of Inflammation*, 8(2), 107–113. <https://doi.org/10.1080/09629359990603>.
- Alves, A. M., Pereira, J. S., Correia, A. V. (2012). *Silvicultura – A Gestão dos Ecossistemas Florestais*. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa.
- Ambrosi, M., Cameron, N. R., & Davis, B. G. (2005). Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 3(9), 1593. <https://doi.org/10.1039/b414350g>.
- Antunes, R. V., & Coelho, L. C. B. B. (1994). Identification of lectin activity in the hemolymph of *Castnia licus* Drury, a sugar-cane giant borer (Lepidoptera-Castniidae). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 47(1), 33–37. <https://doi.org/10.1007/BF02788673>.
- Bae, S. M., Lee, C. H., Cho, Y. L., Nam, K. H., Kim, Y. W., Kim, C. K., ... Ahn, W. S. (2005). Two-dimensional gel analysis of protein expression profile in squamous cervical cancer patients. *Gynecol Oncol*, 99, 26–35. [https://doi.org/S0090-8258\(05\)00390-2](https://doi.org/S0090-8258(05)00390-2) [pii] 10.1016/j.ygyno.2005.05.041.
- Baldus, S. E., Engelmann, K. and Hanisch, F. G. MUC1 and the MUCs: a family of human mucins with impact in cancer biology. *Crit Rev Clin Lab Sci*, v. 41, n. 2, p. 189-231, 2004. ISSN 1040-8363 (Print) 1040-8363.
- Barros, L., Carvalho, A. M., Morais, J. S., Ferreira, I. R. (2010). Strawberry-tree, blackthorn and rose fruit: Detailed characterisation.
- Blum, H., Beier, H., & Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8(2), 93–99. <https://doi.org/10.1002/elps.1150080203>.
- Boyd, W. C. and Shapleigh, E. Separation of individuals of any blood group into secretors and non-secretors by use of a plant agglutinin (lectin). *Blood*, v. 9, n. 12, p. 1194-8, Dec 1954. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Caixinhas, L. (1987). *Lexicoteca. Moderna Enciclopédia Universal*. Círculo de Leitores, 12: 22.

Chevallet, M., Luche, S., & Rabiloud, T. (2006). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature Protocols*.

Cho, W., Jung, K. and Regnier, F. E. Sialylated Lewis x antigen bearing glycoproteins in human plasma. *J Proteome Res*, v. 9, n. 11, p. 5960-8, Nov 5 2010. ISSN 1535-3893.

Cooper, K., Squires, H., Carroll, C., Papaioannou, D., Booth, A., Logan, R. F., Maguire, C., Hind, D. and Tappenden, P. Chemoprevention of colorectal cancer: systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess*, v. 14, n. 32, p. 1-206, Jun 2010. ISSN 1366-5278.

Creste, S., Neto, A. T., & Figueira, A. (2001). Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19(4), 299–306. <https://doi.org/10.1007/BF02772828>.

Crocker, P. R. (2005). Siglecs in innate immunity. *Curr Opin Pharmacol*. 5(4): 431-437.

Daniels, G., & Bromilow, I. (2007). Essential Guide to Blood Groups. *Blood*. <https://doi.org/10.1002/9781444325188>.

De Freitas Junior, J. C. and Morgado-Diaz, J. A. The role of N-glycans in colorectal cancer progression: potential biomarkers and therapeutic applications. *Oncotarget*, v. 7, n. 15, p. 19395-413, Apr 12 2016. ISSN 1949-2553.

De Hoff, P. L., Brill, L. M. and Hirsch, A. M. Plant lectins: the ties that bind in root symbiosis and plant defense. *Mol Genet Genomics*, v. 282, n. 1, p. 1-15, Jul 2009. ISSN 1617-4623.

De Mejia, E. G. and Prisecaru, V. I. Lectins as bioactive plant proteins: a potential in cancer treatment. *Crit Rev Food Sci Nutr*, v. 45, n. 6, p. 425-45, 2005. ISSN 1040-8398 (Print) 1040-8398.

Decker, E. L., Parsons, J. and Reski, R. Glyco-engineering for biopharmaceutical production in moss bioreactors. *Front Plant Sci*, v. 5, p. 346, 2014. ISSN 1664-462x.

Dennis, J. W., Laferte, S., Waghorne, C., Breitman, M. L. and Kerbel, R. S. Beta 1-6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis. *Science*, v. 236, n. 4801, p. 582-5, May 1 1987. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075.

Direito, R., Lima, A., Rocha, J., Ferreira, R. B., Mota, J., Rebelo, P., ... Figueira, M. E. (2017). Dyospiros kaki phenolics inhibit colitis and colon cancer cell proliferation, but not gelatinase activities. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 46, 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.03.002>.

Eichinger, D. (2001) A role for a galactose lectin and ligands during encystment of *Entamoeba*. *Histol. Histopathol.*, 14(1): 217-226.

Faheina-Martins, G. V., da Silveira, A. L., Cavalcanti, B. C., Ramos, M. V., Moraes, M. O., Pessoa, C., and Araujo, D. A. Antiproliferative effects of lectins from *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* in human leukemia cell lines. *Toxicol In Vitro*, v. 26, n. 7, p. 1161-9, Oct 2012. ISSN 0887-2333.

Faye, L., Chrispeels, M. J. (1985). Characterization of N-linked oligosaccharides by affino blotting with concanavalin A-peroxidase and treatment of the blots with glycosidases. *Anal. Biochem.* 145: 218-224.

Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J. W., Comber, H., Forman, D. and Bray, F. Reprint of: Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*, v. 51, n. 9, p. 1201-2, Jun 2015. ISSN 0959-8049.

Fortalezas, S., Tavares, L., Pimpão, R., Tyagi, M., Pontes, V., Alves P.M., et al., (2010). Antioxidant properties and neuroprotective capacity of strawberry tree fruit. *Nutrients*. 2: 214-229.

Fu, L. L., Zhou, C. C., Yao, S., Yu, J. Y., Liu, B. and Bao, J. K. Plant lectins: targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 43, n. 10, p. 1442-9, Oct 2011. ISSN 1357-2725.

Gabor, F., Klausegger, U., Wirth, M. (2001). The interaction between wheat germ agglutinin and other plant lectins with prostate cancer cells Du-145. *International Journal of Pharmaceutics*, V.221, 35-47.

Gallegos, B., Martinez, R., Perez, L., Del Socorro Pina, M., Perez, E. and Hernandez, P. Lectins in human pathogenic fungi. *Rev Iberoam Micol*, v. 31, n. 1, p. 72-5, Jan-Mar 2014. ISSN 1130-1406.

Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Alnemri, E. S., Altucci, L., Andrews, D., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Baehrecke, E. H., Bazan, N. G., Bertrand, M. J., Bianchi, K., Blagosklonny, M. V., Blomgren, K., Borner, C., Bredesen, D. E., Brenner, C., Campanella, M., Candi, E., Cecconi, F., Chan, F. K., Chandel, N. S., Cheng, E. H., Chipuk, J. E., Cidlowski, J. A., Ciechanover, A., Dawson, T. M., Dawson, V. L., De Laurenzi, V., De Maria, R., Debatin, K. M., Di Daniele, N., Dixit, V. M., Dynlacht, B. D., El-Deiry, W. S., Fimia, G. M., Flavell, R. A., Fulda, S., Garrido, C., Gougeon, M. L., Green, D. R., Gronemeyer, H., Hajnoczky, G., Hardwick, J. M., Hengartner, M. O., Ichijo, H., Joseph, B., Jost, P. J., Kaufmann, T., Kepp, O., Klionsky, D. J., Knight, R. A., Kumar, S., Lemasters, J. J., Levine, B., Linkermann, A., Lipton, S. A., Lockshin, R. A., Lopez-Otin, C., Lugli, E., Madeo, F., Malorni, W., Marine, J. C., Martin, S. J., Martinou, J. C., Medema, J. P., Meier, P., Melino, S., Mizushima, N., Moll, U., Munoz-Pinedo, C., Nunez, G., Oberst, A., Panaretakis, T., Penninger, J. M., Peter, M. E., Piacentini, M., Pinton, P., Prehn, J. H., Puthalakath, H., Rabinovich, G. A., Ravichandran, K. S., Rizzuto, R., Rodrigues, C. M., Rubinsztein, D. C., Rudel, T., Shi, Y., H. U. Simon, H. U., Stockwell, B. R., Szabadkai, G., Tait, S. W., Tang, H. L., Tavernarakis, N., Tsujimoto, Y., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P., Villunger, A., Wagner, E. F., Walczak, H., White, E., Wood, W. G., Yuan, J., Zakeri, Z., Zhivotovsky, B., Melino, G. and Kroemer, G.. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ*, v. 22, n. 1, p. 58-73, Jan 2015. ISSN 1350-9047.

Giacometti, J. (2015). Plant lectins in cancer prevention and treatment | Biljni lektini u prevenciji i liječenju raka. *Medicina Fluminensis*, 51(2), 211–229.

Goetz, J. A., Mechref, Y., Kang, P., Jeng, M. H., & Novotny, M. V. (2009). Glycomic profiling of invasive and non-invasive breast cancer cells. *Glycoconjugate Journal*, 26(2), 117–131. <https://doi.org/10.1007/s10719-008-9170-4>.

Goldstein, I. J., Hughes and R. C., Monsigny, M. What should be called a lectin? *Nature* 285, 66. 1980.

Grady, W. M. and Carethers, J. M. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*, v. 135, n. 4, p. 1079-99, Oct 2008. ISSN 0016-5085.

Hakomori, S. (1996). Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism. *Cancer Res.* 56(23): 5309-5318.

Hanahan, D. and Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 4 2011. ISSN 0092-8674.

Hartley, M. R. and Lord, J. M. Cytotoxic ribosome-inactivating lectins from plants. *Biochim Biophys Acta*, v. 1701, n. 1-2, p. 1-14, Sep 1 2004. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002.

Hatano, K., Miyamoto, Y., Mori, M., Nimura, K., Nakai, Y., Nonomura, N. and Kaneda, Y. Androgen-regulated transcriptional control of sialyltransferases in prostate cancer cells. *PLoS One*, v. 7, n. 2, p. e31234, 2012. ISSN 1932-6203.

Hauselmann, I. and Borsig, L. Altered Tumor-Cell Glycosylation Promotes Metastasis. *Front Oncol*, v. 4, p. 28, 2014. ISSN 2234-943X (Print) 2234-943x.

Huang, W. L., Li, Y. G., Lv, Y. C., Guan, X. H., Ji, H. F. and Chi, B. R. Use of lectin microarray to differentiate gastric cancer from gastric ulcer. *World J Gastroenterol*, v. 20, n. 18, p. 5474-82, May 14 2014. ISSN 1007-9327.

Imberty, A., Casset, F., Gegg, C. V., Etzler, M. E. and Perez, S. Molecular modelling of the Dolichos biflorus seed lectin and its specific interactions with carbohydrates: alpha-D-N-acetyl-galactosamine, Forssman disaccharide and blood group A trisaccharide. *Glycoconj J*, v. 11, n. 5, p. 400-13, Oct 1994. ISSN 0282-0080 (Print) 0282-0080.

Islam, B; KHAN, A. Lectins: To Combat Infections, Protein Purification: Dr. Rizwan Ahmad (Ed.) 2012.

Itzkowitz, S. H., Bloom, E. J., Kokal, W. A., Modin, G., Hakomori, S. I., Kim, T. S. (1990). A novel mucin antigen associated with prognosis in colorectal cancer patients. *Cancer*, 66: 1960-1966.

Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer Journal for Clinicians* 61(2): 69-90.

Jones, S., Thornton, J. M. (1996). Review Principles of protein-protein interactions, 93: 13-20.

Jorgensen, M. L., Young, J. M. and Solomon, M. J. Optimal delivery of colorectal cancer follow-up care: improving patient outcomes. *Patient Relat Outcome Meas*, v. 6, p. 127-38, 2015. ISSN 1179-271x.

Jun, L., Yuanshu, W., Yanying, X., Zhongfa, X., Jian, Y., Fengling, W., Xianjun, Q., Kokudo, N., Wei, T., Weixia, Z. and Shuxiang, C. Altered mRNA expressions of sialyltransferases in human gastric cancer tissues. *Med Oncol*, v. 29, n. 1, p. 84-90, Mar 2012. ISSN 1357-0560.

Kabir, S. (1998). Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research. *J. Immunol. Meth.* 212: 193-211.

Kannagi, R., Yin, J., Miyazaki, K. and Izawa, M. Current relevance of incomplete synthesis and neo-synthesis for cancer-associated alteration of carbohydrate determinants--Hakomori's concepts revisited. *Biochim Biophys Acta*, v. 1780, n. 3, p. 525-31, Mar 2008. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002.

Khan, F., Khan, R. H., Sherwani, A., Mohmood, S., & Azfer, M. a. (2002). Lectins as markers for blood grouping. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental*

*and Clinical Research*, 8(12), RA293-A300. <https://doi.org/10.13140/2.1.1744.9606>.

Kim, J. K., Noh, J. H., Jung, K. H., Eun, J. W., Bae, H. J., Kim, M. G., Chang, Y. G., Shen, Q., Park, W. S., Lee, J. Y., Borlak, J. and Nam, S. W. Sirtuin7 oncogenic potential in human hepatocellular carcinoma and its regulation by the tumor suppressors MiR-125a-5p and MiR-125b. *Hepatology*, v. 57, n. 3, p. 1055-67, Mar 2013. ISSN 0270-9139.

Kim, W. H., Park, W. B, Gao, B., Jung, M. H. (2004). Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential in Korean mistletoe lectin-induced apoptosis in human hepatocarcinoma cells. *Mol. Pharmacol.* 66: 1383-1396.

Kobayashi, H., Boelte, K. C. and LIN, P. C. Endothelial cell adhesion molecules and cancer progression. *Curr Med Chem*, v. 14, n. 4, p. 377-86, 2007. ISSN 0929-8673 (Print) 0929-8673.

Kornbluth, A., Sachar, D.B. (2010). Ulcerative colitis practice guidelines in adults: American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am J Gastroenterol*, 105 (3), 501-523.

Kreuzaler, P. and Watson, C. J. Killing a cancer: what are the alternatives? *Nat Rev Cancer*, v. 12, n. 6, p. 411-24, May 11 2012. ISSN 1474-175x.

Kudo, T., Ikehara, Y., Togayachi, A., Morozumi, K., Watanabe, M., Nakamura, M., Nishihara, S., Narimatsu, H. (1998). Up-regulation of a set of glycosyltransferase genes in human colorectal cancer. *Lab Investig.* 78: 797-811.

Lahm, H., Andre, S., Hoefflich, A., Kaltner, H., Siebert, H. C., Sordat, B., von der Lieth, C. W., Wolf, E. and Gabius, H. J. Tumor galectinology: insights into the complex network of a family of endogenous lectins. *Glycoconj J*, v. 20, n. 4, p. 227-38, 2004. ISSN 0282-0080 (Print) 0282-0080.

Lee, K. H., Yim, E. K., Kim, C. J., Namkoong, S. E., Um, S. J., & Park, J. S. (2005). Proteomic analysis of anti-cancer effects by paclitaxel treatment in cervical cancer cells. *Gynecol Oncol*, 98(1), 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2005.04.010>

Lis, H. and Sharon, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *. Chem. Rev.* 98, 637–674. 1998.

Liu, B., Bian, H. jiao, & Bao, J. ku. (2010). Plant lectins: Potential antineoplastic drugs from bench to clinic. *Cancer Letters*, 287(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.05.013>.

Liu, B., Cheng, Y., Zhang, B., Bian, H.J., (2009). Polygonatum cyrtonema lectin induces apoptosis and autophagy in human melanoma A375 cells through a mitochondria-mediated ROS-p38-p53 Pathway. *Cancer Letters*, V.275, 54-60.

Liu, B., Xu, X. C., Cheng, Y., Huang, J., Liu, Y. H., Liu, Z., Min, M. W., Bian, H. J., Chen, J., Bao, J. K. (2008). Apoptosis inducing effect and structural basis of Polygonatum cyrtonema lectin and chemical modification properties on its mannose-binding sites. *BMB Rep.* 41: 369–375.

Liu, F., Bevins, C. L. (2010). A sweet target for innate immunity. *Nature Medicine*, 16: 263-264.

Liu, Z., Luo, Y., Zhou, T. T., & Zhang, W. Z. (2013). Could plant lectins become promising anti-tumour drugs for causing autophagic cell death? *Cell Proliferation*, 46(5), 509–515. <https://doi.org/10.1111/cpr.12054>.



Loris, R., Hamelryck, T., Bouckaert, J. and Wyns, L. Legume lectin structure. *Biochim Biophys Acta*, v. 1383, n. 1, p. 9-36, Mar 3 1998. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002.

Loris, R. Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochim Biophys Acta*, v. 1572, n. 2-3, p. 198-208, Sep 19 2002. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002.

Marin, J. J., Sanchez de Medina, F., Castano, B., Bujanda, L., Romero, M. R., Martinez-Augustin, O., Moral-Avila, R. D. and Briz, O. Chemoprevention, chemotherapy, and chemoresistance in colorectal cancer. *Drug Metab Rev*, v. 44, n. 2, p. 148-72, May 2012. ISSN 0360-2532.

Miguel, M. G., Faleiro, M. L., Guerreiro, A. C., & Antunes, M. D. (2014). *Arbutus unedo* L.: Chemical and biological properties. *Molecules*, 19(10), 15799–15823. <https://doi.org/10.3390/molecules191015799>.

Miyagi, T., Takahashi, K., Hata, K., Shiozaki, K. and Yamaguchi, K. Sialidase significance for cancer progression. *Glycoconj J*, v. 29, n. 8-9, p. 567-77, Dec 2012. ISSN 0282-0080.

Miyagi, T., Wada, T., Yamaguchi, K. and Hata, K. Sialidase and malignancy: a minireview. *Glycoconj J*, v. 20, n. 3, p. 189-98, 2004. ISSN 0282-0080 (Print) 0282-0080.

Moremen, K. W., Tiemeyer, M. and Nairn, A. V. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 13, n. 7, p. 448-62, Jul 2012. ISSN 1471-0072.

Mori, Y., Kondo, T., Yamada, T., Tsuchida, A., Aoki, T., & Hirohashi, S. (2005). Two-dimensional electrophoresis database of fluorescence-labeled proteins of colon cancer cells. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 823(2), 82–97. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.05.024>.

Mowat, C., Cole, A., Windsor, A., Ahmad, T., Arnott, I., Driscoll, R., Mitton, S., Orchard, T., Rutter, M., Younge, L., Lees, C., Ho, G., Satsangi, J., Bloom, S. (2011). Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults – On behalf of the IBD Section of the British Society of Gastroenterology. *Gut*, in doi:10.1136/gut.2010.224154.

Nakajima, K., Inomata, M., Iha, H., Hiratsuka, T., Etoh, T., Shiraishi, N., ... Kitano, S. (2015). Establishment of new predictive markers for distant recurrence of colorectal cancer using lectin microarray analysis. *Cancer Medicine*, 4(2), 293–302. <https://doi.org/10.1002/cam4.342>.

Oliveira, I., Baptista, P., Malheiro, R., Casal, S., Bento, A., Pereira, J. A. (2011). Influence of strawberry tree fruit ripening stage on chemical composition and antioxidant activity. *Food Research International*. 44 (5):1401-1407.

Park, J. J. and Lee, M. Increasing the alpha 2, 6 sialylation of glycoproteins may contribute to metastatic spread and therapeutic resistance in colorectal cancer. *Gut Liver*, v. 7, n. 6, p. 629-41, Nov 2013. ISSN 1976-2283.

Patwa, T., Li, C., Simeone, D. M. and Lubman, D. M. Glycoprotein analysis using protein microarrays and mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*, v. 29, n. 5, p. 830-44, Sep-Oct 2010. ISSN 0277-7037.

Pawar, P., Gilda, S., Sharma, S., Jagtap, S., Paradkar, A., Mahadik, K., Ranjekar, P., Harsulkar, A. (2011). Rectal gel application of *Withania somnifera* root extract expounds anti inflammatory and mucorestorative activity in TNBS-induced Inflammatory Bowel Disease. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11 (34), 1-9.

Peumans, W. J. and Damme, E. J. M. V. Lectins as Plant Defense Proteins: *Plant Physiol.* (1995) 109: 347-352 1995.

Pithadia, A., Jain, S. (2011). Treatment of inflammatory bowel disease (IBD). *Pharmacological Reports*, 63, 629-642.

Plummer, D. T. An Introduction to Practical Biochemistry. 3rd Ed.. McGraw-Hill International Limited. U.K. 1987.

Pohleven, J., Štrukelj, B., & Kos, J. (2012). Affinity Chromatography of Lectins. *Affinity Chromatography*, 49–74. <https://doi.org/10.5772/36578>.

Prada, M., Arizpe, D. (2008). Guia de Propagação de Árvores e Arbustos Ribeirinhos – Um Contributo para o Restauro de Rios na Região Mediterrânica. ISA Press: 27-29.

Rabinovich, G. A. and Croci, D. O. Regulatory circuits mediated by lectin-glycan interactions in autoimmunity and cancer. *Immunity*, v. 36, n. 3, p. 322-35, Mar 23 2012. ISSN 1074-7613.

Ratanapo, S., Ngamjunyaporn, W., Chulavatnatol, M. (2001). Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae*. *Plant Science*, V.160, 739-744.

Rego, E. J., de Carvalho, D. D., Marangoni, S., de Oliveira, B. and Novello, J. C. Lectins from seeds of *Crotalaria pallida* (smooth rattlebox). *Phytochemistry*, v. 60, n. 5, p. 441-6, Jul 2002. ISSN 0031-9422 (Print) 0031-9422.

Reis, C. A., Osorio, H., Silva, L., Gomes, C., David, L. (2010). Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. *J Clin Pathol.* 63(4): 322-329.

Reymond, M. A., & Schlegel, W. (2007). Proteomics in Cancer, 44(7), 103–142. [https://doi.org/10.1016/S0065-2423\(07\)44004-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2423(07)44004-5).

Ribeiro, A., Catarino, S., & Ferreira, R. B. (2012). Multiple lectin detection by cell membrane affinity binding. *Carbohydrate Research*, 352, 206–210. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.01.024>.

Robbins, & Cotran. (2010). *Patologia - Bases patológicas da doença*. Elsevier Editora Ltda.

Robyt, J. F. and White, B. J. Biochemical Techniques – Theory and Practice. . 2nd Ed. Waveland Press Inc. U.S.A. 1990.

Rolim, H. M. L., Rodrigues, O. G., Nascimento, S. C., Figuerêdo-Silva, J., Coelho, L. C. B. B., Correia, M. T. S. (2001). Effect of glucose/mannose lectins in larynx epidermoide carcinoma cells (HEp-2). VI Phamatech - III annual Meeting of the SBTf. DD-117.

Rovira V, V. S. (2015). Identification of Apoptotic Cells by Means of Lectin Histochemistry: State of the Art Review. *Journal of Cytology & Histology*, 6(2). <https://doi.org/10.4172/2157-7099.1000309>.

Rüdiger, H., Gabius, H. (2001). Review. Plant Lectins: Occurrence, biochemistry, function and applications. *Glycoconjugate Journal*, 18: 589-613.

Santos, C. N., Ferreira, R. B. and Teixeira, A. R. Seed proteins of *Lupinus mutabilis*. *J. Agric. Food Chem.* 45: 3821-3825 1997.

Sharon, N., Lis, H. (1972). Lectins: cell-agglutinating and sugar specific proteins. *Science*, V.177, 949-959.

Sharon, N. (1983). Lectin receptors as lymphocyte surface markers. *Adv. Immunol.* 34: 213-298.

Sharon, N., Lis, H. (1989). Lectins as cell recognition molecules. *Science*, 246, 227-234.

Sharon, N., Lis, H. (1990). Legume lectins – a large family of homologous proteins. *FASEB Journal*, V.4, 3198-3208.

Sharon, N., Lis, H. (1993). Carbohydrates in cell recognition. *Scientific American*, Jan., 7480.

Sharon, N., Lis, H. (2003). *Lectins*. 2.<sup>a</sup> Edition. Springer Ed. 118-122.

Sharon, N., Lis, H. (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 14: 53-62.

Shay, G., Lynch, C. C., & Fingleton, B. (2015). Moving targets: Emerging roles for MMPs in cancer progression and metastasis. *Matrix Biology*, 44–46, 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.01.019>.

Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., & Mann, M. (1996). Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels*, 68(5), 850–858. <https://doi.org/10.1021/ac950914h>.

Shibao, K., Izumi, H., Nakayama, Y., Ohta, R., Nagata, N., Nomoto, M., Matsuo, K., Yamada, Y., Kitazato, K., Itoh, H., Kohno, K. (2002). Expression of UDP-N-acetyl- $\alpha$ -D galactosamine polypeptide GalNAc N-acetylgalactosaminyl transferase-3 in relation to differentiation and prognosis in patients with colorectal carcinoma. *Cancer*. V.94, 7: 1939-1946.

Silva, H. C., Pinto, L. S., Teixeira, E. H., Kyria, S., Cavada, B. S. and Silva, A. L. C. BUL: A novel lectin from *Bauhinia unguolata* L. seeds with fungistatic and antiproliferative activities: *Process Biochemistry* 2013.

Silva, M. C., de Paula, C. A., Ferreira, J. G., Paredes-Gamero, E. J., Vaz, A. M., Sampaio, M. U., Correia, M. T. and Oliva, M. L. *Bauhinia forficata* lectin (BfL) induces cell death and inhibits integrin-mediated adhesion on MCF7 human breast cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, Mar 15 2014. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002.

Silva, S., Regina, C., & Souza, B. De. (2009). Extração e análise eletroforética em gel de poliácridamida ( SDS-PAGE ) de proteínas totais de folhas e raízes de *Piper tuberculatum*. *ACTA Amazonica*, 39(2), 255–260. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672009000200002>.

Silverberg, M., Satsangi, J., Ahmad, T., Arnott, I.D., Bernstein, C.N., Brant, S.R., Caprilli, R., Colombel, J.F., Gasche, C., Geboes, K., Jewell, D.P., Karban, A., Loftus, E.V.Jr., Peña, A.S., Riddell, R.H., Sachar, D.B., Schreiber, S., Steinhart, A.H., Targan, S.R., Vermeire, S., Warren, B.F. (2005). Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Canadian Journal of Gastroenterology*, 19 (A), 5-36.

Srinivas, V. R., Reddy, G. B., Ahmad, N., Swaminathan, C. P., Mitra, N. and Surolia, A. Legume lectin family, the 'natural mutants of the quaternary state', provide insights into the

relationship between protein stability and oligomerization. *Biochim Biophys Acta*, v. 1527, n. 3, p. 102-11, Aug 15 2001. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002.

Stein, A., Hiemer, S. and Schmoll, H. J. Adjuvant therapy for early colon cancer: current status. *Drugs*, v. 71, n. 17, p. 2257-75, Dec 03 2011. ISSN 0012-6667.

Stillmark, H. Ueber Ricin, ein giftiges Ferment aus dem Samen von *Ricinus communis* L. und einigen anderen Euphorbiaceen *Arb. Pharmak. Inst. Dorpat* 3, 59–151 1888.

Sunderic, M., Sediva, A., Robajac, D., Miljus, G., Gemeiner, P., Nedic, O. and Katrlík, J. Lectin-based protein microarray analysis of differences in serum alpha-2-macroglobulin glycosylation between patients with colorectal cancer and noncancer persons. *Biotechnol Appl Biochem*, Jun 15 2015. ISSN 0885-4513.

Tateno, H., Uchiyama, N., Kuno, A., Togayachi, A., Sato, T., Narimatsu, H., & Hirabayashi, J. (2007). A novel strategy for mammalian cell surface glycome profiling using lectin microarray. *Glycobiology*, 17(10), 1138–1146. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwm084>.

Tresca, A.J. (2015). The differences between ulcerative colitis and crohn's disease.

Tyleckova, J., Hrabakova, R., Mairychova, K., Halada, P., Radova, L., Dzubak, P., ... Kovarova, H. (2012). Cancer cell response to anthracyclines effects: Mysteries of the hidden proteins associated with these drugs. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(12), 15536–15564. <https://doi.org/10.3390/ijms131215536>.

Valadez-Vega, C., Alvarez-Manilla, G., Riverón-Negrete, L., García-Carrancá, A., Morales-González, J. A., Zuniga-Pérez, C., ... Morales-González, Á. (2011). Detection of cytotoxic activity of lectin on human colon adenocarcinoma (Sw480) and epithelial cervical carcinoma (C33-A). *Molecules*, 16(3), 2107–2118. <https://doi.org/10.3390/molecules16032107>.

Van Damme, E., Lannoo, N. and Peumans, W. Chapter 3 Plant lectins. *Advances in Botanical Research*: 107-209 p. 2008.

Van Damme, E., Peumans, W., Barre, A. and Rougé, P. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles *Crit Rev Plant Sci*; 17:575–692. 1998.

Varki, A., Kannagi, R. and Toole, B. P. Glycosylation Changes in Cancer. *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California, 2009.

Vasconcelos, I. M. and Oliveira, J. T. Antinutritional properties of plant lectins. *Toxicon*, v. 44, n. 4, p. 385-403, Sep 15 2004. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101.

Vega, N., Perez, G. (2006). Isolation and characterization of a *Salvia bogotensis* seed lectin specific for the Tn antigen. *Phytochemistry*, V.67, 347-355.

Wait, R., Harry, R. A., Westbrook, J. A., Wheeler, C. H., & Dunn, M. J. (2000). A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption / ionization and electrospray ionization- mass spectrometry *Proteomics and 2-DE. Heart And Lung*, 1.

Wang, B. G., Wu, Y., Qiu, L., Shah, N. P., Xu, F., & Wei, H. (2016). Integration of genomic and proteomic data to identify candidate genes in HT-29 cells after incubation with *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521. *J Dairy Sci*, 1–15. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10577>.

Wang, H., Gao, J., et al. (2000). A new lectin with highlt potent anti-hepatoma and antisarcoma activities from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 275(3): 810-816.

Watson, A. J. (2006). An overview of apoptosis and the prevention of colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol. Review.* 57(2): 107-121.

Weis, W. I. and Drickamer, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu Rev Biochem*, v. 65, p. 441-73, 1996. ISSN 0066-4154 (Print) 0066-4154.

WHO, W. H. O. (2014). Portugal, 2.

Yang, S., Li, Y., Shah, P. and Zhang, H. Glycomic analysis using glycoprotein immobilization for glycan extraction. *Anal Chem*, v. 85, n. 11, p. 5555-61, Jun 4 2013. ISSN 0003-2700.

Yau, T., Dan, X., Ng, C. C. W., & Ng, T. B. (2015). Lectins with potential for anti-cancer therapy. *Molecules*, 20(3), 3791–3810. <https://doi.org/10.3390/molecules20033791>.

